UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 21

ÉTUDES SUR LE GENRE CORYNEBACTERIUM

Caractères bactériologiques
Constitution des acides desoxyribonucléiques

THESE

Pour le Doctorat en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

Présentée et soutenue publiquement en novembre 1961

PAR

Georges MICHEL

Pharmacien
Licencié ès Sciences

Membres du Jury

MM. BOUISSET	Président	
BOURBON		Assesseurs
ROUX		
BREUILLAUD		
PITET	Suppléant	

TOULOUSE
IMPRIMERIE DU VIGUIER
6, rue Ninau, 6
—
1961

MICHEL (Georges)

Études sur le genre Corynebacterium. Caractères bactériologiques Constitution des acides désoxyribonucléiques

Toulouse, Imprimerie du Viguier 1961, in-8, 76 pages

Thèse Médecine, Toulouse n° 21

MICHEL (Georges)

Études sur le genre Corynebacterium. Caractères bactériologiques Constitution des acides désoxyribonucléiques

Toulouse, Imprimerie du Viguier 1961, in-8, 76 pages

Thèse Médecine, Toulouse n° 21

MICHEL (Georges)

Études sur le genre Corynebacterium. Caractères bactériologiques Constitution des acides désoxyribonucléiques

Toulouse, Imprimerie du Viguier 1961, in-8, 76 pages

Thèse Médecine, Toulouse n° 21

MICHEL (Georges)

Études sur le genre Corynebacterium. Caractères bactériologiques Constitution des acides désoxyribonucléiques

Toulouse, Imprimerie du Viguier 1961, in-8, 76 pages

Thèse Médecine, Toulouse n° 21

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0049

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 21

ÉTUDES SUR LE GENRE CORYNEBACTERIUM

Caractères bactériologiques
Constitution des acides desoxyribonucléiques

THESE

Pour le Doctorat en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

Présentée et soutenue publiquement en novembre 1961

PAR

Georges MICHEL

Pharmacien
Licencié ès Sciences

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Membres du Jury

MM.	BOUISSET	Président
	BOURBON	
	ROUX	Assesseurs
	BREUILLAUD	
	PITET	Suppléant

TOULOUSE
IMPRIMERIE DU VIGUIER
6, rue Ninau, 6

1961

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	MM. LAZORTHES.
1er Assesseur	BLANC.
2e Assesseur	N.
Doyens honoraires	GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. VALLOIS.	MM. RIBAUT.
CLERMONT.	NANTA.
DUCUING.	DELAS.
TAPIE.	RISER.
	SOULA.

SECTION MÉDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MÉRIEL. GADRAT.
Clinique chirurgicale et Gynécologie	FABRE (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer	GRIMOUD.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie	VIRENQUE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX.
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.	MOREL.
Clinique des maladies des Voies urinaires	LHEZ.
Clinique médicale infantile et Puériculture	SOREL.
Clinique de Neurologie et Psychiatrie	GERAUD.
Clinique obstétricale	GUILHEM.
Clinique Odonto-Stomatologie	N...
Clinique Ophtalmologique	CALMETTES.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale	CALVET.
Clinique Rhumatologique	RUFFIÉ (R.).
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU.
Accouchement et Obstétricie sociale	PONTONNIER.
Anatomie	LAZORTHES.
Anatomie appliquée	POULHÈS.
Anatomie pathologique	FABRE (J.).
Bactériologie, Hygiène, Médecine sociale	ANDRIEU.
Chimie biologique	VALDIGUIÉ (P.).
Electroradiologie	MARQUÈS.
Embryologie générale	BROUSSY (Jean).
Histologie	BIMES.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	DARNAUD.
Médecine légale et du Travail	PLANQUES.
Médecine Sociale	BOUNHOURE.
Parasitologie	BOUISSET.
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN.
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.
Physico-Chimie	AUVERGNAT.
Physiologie	LAPORTE (Y.).
Physiologie appliquée et Parmacologie	BAISSET.
Physique biologique et médicale.	BUGNARD.
Propédeutique médicale	N...
Thérapeutique	DARDENNE.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	MM. COULOUMA.
Pathologie médicale	LAPORTE (J.).
Bactériologie	Mme ENJALBERT.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale	MM. DOUSTE-BLAZY.
Physique médicale	BRU.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie	MM. BASTIDE.
Anatomie pathologique	BOUISSOU.
Anesthésiologie	LARENG.
Carcinologie	ESTRADE.
Histologie et embryologie	PLANEL.
Parasitologie	RUFFIÉ (J.).
Pathologie expérimentale	GLEIZES.
Physiologie.	MONTASTRUC.
Physiologie	BESSOU.
Physique Médicale	COMMANAY.

AGRÉGÉS

Médecine générale	MM. MONNIER. RIBAUT. DELAUDE. CALAZEL. RASCOL.
Chirurgie générale	ANJALBERT. FICAT. PASQUIÉ. SOUQUET. SARRAZIN.
Dermatologie Syphiligraphie	DUPRÉ.
Hydrologie	DENARD.
Médecine légale	GRÈZE-RUEFF.
Obstétrique.	ESPAGNO.
Odontostomatologie	CADENAT (H.).
Pédiâtrie	BARDIER (A.).

AGREGES LIBRES

Anatomie	MM. THOMAS.
Ophtalmologie	DEODATI.
O.R.L.	CLAUX.
Pathologie Chirurgicale	DIEULAFÉ.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et Cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et Hygiène Industrielle	MM. BOURBON.
Chimie Pharmaceutique	BLANC.
Matière médicale	VINCENT.
Pharmacie chimique et Pharmacodynamie	CAUJOLLE.
Pharmacie galénique	STANISLAS.
Zoologie	ROUX.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	M. COUTURIER.

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mme CAUJOLLE.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Microbiologie	MM. BREUILLAUD.
Sciences physiques	PITET.
Toxicologie	BROUSSY (G.).

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal	M. ROCHE.
Secrétaire	BERRUT.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A MA FEMME

A MA FAMILLE

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. BOUISSET

Officier de la Légion d'honneur
Médaille Militaire
Professeur de Parasitologie à la Faculté

Nous vous remercions d'avoir bien voulu nous accepter parmi vos collaborateurs. Nous vous exprimons toute notre gratitude pour la constante bienveillance que vous nous manifestez et l'intérêt que vous voulez bien accorder au déroulement de notre carrière universitaire.

Nous vous prions de croire à notre profonde déférence et à notre respectueux dévouement.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOURBON

Professeur de Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle

Nous n'oublions pas que, du temps de nos études, vous nous avez accueilli dans votre laboratoire et nous vous exprimons notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. ROUX

Professeur sans chaire

En le remerciant du grand honneur qu'il nous fait en acceptant de siéger à notre Jury de Thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BREUILLAUD

Maître de Conférences de Sciences Naturelles

Nous vous remercions de nous avoir inspiré et guidé dans ce travail. Nous désirons qu'il soit le témoignage de notre profonde déférence et de notre respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PITET

Maître de Conférences de Sciences Physiques

Nous vous adressons nos bien sincères remerciements pour l'aide que vous nous avez apportée dans nos travaux et pour les conseils que vous avez bien voulu nous donner.

A MONSIEUR V. GRIZOU

Assistant de Microbiologie

Avec notre bien sincère amitié.

A NOS AMIS ET COLLABORATEURS
DU SERVICE DE MICROBIOLOGIE

Introduction

Les microorganismes du genre Corynebacterium appartiennent à ce vaste groupe des Actinomycétales que A.R. PRÉVOT *considère comme un pont reliant les Eubactériales aux formes végétales inférieures :*

Sous-embranchement II : MYCOBACTERIA

Classe I : *Actinomycétales*
Ordre I : *Actinobactériales.*

Famille I : *Spherophoraceae.*
Famille II : *Actinomycetaceae.*

Genre I : — *CORYNEBACTERIUM,*
— *Propionibacterium* (*sous-genre*)

Genre II : — *Actinobacterium,*
— *Bifidibacterium* (*sous-genre*).

Le genre Corynebacterium répond à la définition suivante : « Bâtonnets asporulés, immobiles, aciliés, gram-positifs, présentant des renflements, des granulations métachromatiques et des ramifications. Longueur inférieure à 3 µ 5, Aérobies et anaérobies ».

Ces microorganismes sont fréquemment rencontrés : sur les muqueuses et la peau des animaux (BRUNER-FLEISCHER-BROOKS). *sur les muqueuses et la peau humaine* (BARATT, WELSCH, JAMINON et THIBAUT), *où ils représentent selon les auteurs de* 10 *à* 50 % *de la flore autochtone* (EVANS *et Collaborateurs*, BOUISSET *et Collaborateurs*, BEERENS et DEMONT), *sur les végétaux et dans le sol ou de nombreuses espèces de Corynebacterium ont été décelés par* JENSEN et CRAWFORD. *L'air, par contre, semble en être généralement dépourvu.*

La plupart de ces espèces se comportent comme des saprophytes, certaines d'entre elles seulement sont pathogènes. Parmi celles-ci, Corynebacterium diphteriae, espèce aérobie et anaérobie facultative est parasite stricte de l'homme (DUMAS) *et sa localisation est le plus souvent pharyngée ; c'est aussi la seule espèce toxinogène du groupe.* PRÉVOT *et ses collaborateurs ont décrit sept espèces anaérobies strictes ou microaérophiles que l'on rencontre généralement sur*

les muqueuses de l'homme et qui peuvent provoquer certaines infections particulières groupées sous le terme de corynebactérioses anaérobies.

Quelques espèces sont pathogènes pour les animaux. Il existe enfin des infections végétales provoquées par des Corynebacterium tous aérobies. (ELLIOT-WILSON-WALKER).

De très nombreuses espèces de Corynebacterium sont actuellement décrites. Leur nombre varie d'ailleurs selon les auteurs (33 *dans le manuel de détermination de* BERGEY, 61 *dans le dictionnaire des bactéries pathogènes de* HAUDUROY). *A l'exception de certaines d'entre elles dont les caractères biologiques sont évidents* (*c'est en particulier le cas de Corynebacterium diphteriae*) *il ne semble pas que des nomenclatures cohérentes aient été obtenues de sorte qu'il est souvent délicat de diagnostiquer avec exactitude un Corynebacterium quelconque.*

Il est même parfois difficile d'opérer une distinction nette entre le genre Corynebacterium et les genres voisins : Propionibactérium (*dont* PRÉVOT *fait d'ailleurs un sous-genre de Corynebacterium*) *et Actinobacterium en particulier. Quant aux caractères donnés pour une même espèce par différents auteurs, ils présentent souvent des différences importantes. Citons-en quelques exemples :*

Corynebacterium parvum, ne fait fermenter aucun glucide pour HAUDUROY, *fermente légèrement le glucose pour* BERGEY *et fermente complètement glucose, lévulose, galactose, saccharose, lactose, maltose, amidon et glycérol pour* PRÉVOT et COUDURIER.

BEERENS *identifie entre eux Actinobacterium israëli, Act. bovis, Corynebacterium acnes, Corynebacterium avidum et Corynebacterium liquefaciens, et* LENTZE : *Corynebacterium acnes et Corynebacterium renale cuniculi.*

Enfin, RYFF, BROWN et PERGOLA *constatent dans ce groupe un pouvoir de variation tel qu'il leur paraît difficile de donner des définitions valables des différentes espèces. Quant à* PALANT, KHOLOD et BLAGODETELEVA, *ils démontrent la variabilité de bacilles pseudo-diphtériques dans l'organisme des animaux, ce qui aboutirait dans leurs expérimentations à la transformation d'un bacille d'*HOFMANN *en bacille de* LOEFFLER *type gravis et vice-versa.*

Il nous a donc paru nécessaire de faire une étude générale du genre Corynebacterium dans le but de définir si possible des grands groupes d'espèces et d'obtenir des clés de détermination permettant un classement relativement commode des souches fraîchement isolées de leurs biotopes.

Cette étude a porté sur 60 espèces qui comprennent d'une part des souches de référence, qui nous ont été adressées soit par l'Institut Pasteur de Paris, soit par différents laboratoires étrangers :

— *NATIONAL COLLECTION OF TYPE CULTURES*
Central Public health laboratory (*London*).

— *INSTITUTE FOR FERMENTATION*
Juso Nishinocho Higushiyodogawaku, Osaka (Japon).

— *NATIONAL COLLECTION OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA (Angleterre).*

— *DEPARTEMENT OF MICROBIOLOGY*
University J.E. Purkynè, Brno (Tchécoslovaquie).

que nous tenons à remercier ici.

Toutes les autres souches ont été isolées par nous-mêmes, soit à partir de la peau ou des muqueuses humaines, soit à partir du plasma sanguin, soit à partir du sol.

Dans une première partie de ce travail une étude complète de ces souches a été faite tant sur le plan morphologique, que sur le plan physiologique et biochimique.

Cette première étude nous a permis de définir des groupes de Corynebacterium et d'aboutir à des plans de détermination. Elle a été complétée dans une deuxième partie par une étude systématique de l'acide désoxyribonucléique de chacune des souches et par la détermination du rapport :

$$\frac{\text{Adénine} + \text{Thymine}}{\text{Guanine} + \text{Cytosine}}$$

Première Partie

Mode d'étude des Corynebacterium

A) Procédé de culture et d'isolement.

Les Corynebacterium appartiennent à des milieux divers et par là-même, leurs exigences nutritives sont variables.

Les germes isolés du sol et les germes d'origine végétale cultivent facilement sur gélose ordinaire tamponnée à pH 7,2.

Les microorganismes à exigences nutritives complexes (il s'agit généralement de Corynebacterium d'origine humaine) seront cultivés en milieu liquide dont la constitution de base est la suivante :

Chair musculaire	5 kg
Foie de bœuf	1,4 kg
NaCl	19 gr
Eau distillée	25 litres

Macération pendant 2 h à 50°. Ebullition 15 minutes. Double filtration, pH réglé à 7,6-7,7. Précipitation à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes. Filtration, ébullition. Ce milieu de base sera additionné de

Protéose peptone Difco	75 gr
Néo-peptone Difco	12,5 gr
Bacto tryptone	12,5 gr
Yeast extract	75 gr

Répartition selon les techniques habituelles. Stérilisation à 110° pendant 45 minutes.

Cette formule permet d'obtenir un milieu standard, facile à stocker et à préparer et qui convient parfaitement à la croissance de tous les Corynebacterium tant aérobies qu'anaérobies. La constance de sa composition et ses rapports avec le classique milieu VF

permettent d'obtenir des résultats d'analyse biochimique parfaitement comparables d'une expérimentation à l'autre.

Les souches sont ensemencées en séparation sur gélose inclinée pour les espèces aérobies, ou en une série de tubes de gélose profonde (selon la technique décrite par le service des anaérobies de l'Institut Pasteur), pour les espèces microaérophiles.

Les colonies isolées sont repiquées soit sur boîtes de Roux, soit en ballons de Jaubert et Gory, pour réunir la quantité de corps microbiens nécessaires aux analyses.

La croissance est d'ailleurs très variable selon les espèces étudiées et il est important de déterminer la durée de la « phase logarithmique » de manière à décrire les caractères des souches à un même instant, correspondant à la fin de cette phase.

B) Caractérisation des souches.

Les caractères bactériologiques classiques : pouvoir glucidolytique, pouvoir protéolytique, etc..., sont recherchés par les méthodes usuelles.

Pouvoir glucidolytique :

Milieu de base	100 ml
Bleu de bromothymol	1 ctg

Le glucide est apporté au moment de l'emploi sous forme d'une solution concentrée (20 à 30 %) stérilisée par filtration, sa concentration terminale dans le milieu de culture est de 1 %. Comme nous l'avons précédemment indiqué la lecture de la réaction (virage ou non du Bleu de bromothymol) était effectuée à la fin de la période de croissance active pour la souche considérée (fin de la « phase exponentielle » de croissance).

Pouvoir protéolytique :

Milieu de base	1000 ml
Gélatine	120 gr

a) gélatinolyse ;

b) liquéfaction du sérum coagulé. Selon le type aérobie ou anaérobie de la souche étudiée, ce caractère était recherché par ensemencement sur la pente d'un tube de sérum ou sur cubes de sérum coagulé ajoutés au milieu de base ;

c) recherche de la coagulation du lait : par ensemencement des souches dans du lait écrémé stérile, régénéré ou non, selon le type respiratoire de la souche.

Pouvoir indologène : A la fin de la croissance, quelques gouttes du réactif de Kowacks sont ajoutées à la culture. La présence d'indol est indiquée par un anneau rouge cerise.

Réactif de Kowacks :	Paradiméthyl-amino-benzaldéhyde	5 g
	Alcool amylique	75 ml
	Acide chlorydrique pur	25 ml

Production d'SH2 : Un papier filtre stérile imprégné d'une solution saturée de sous acétate de plomb est placé dans l'atmosphère du tube de culture. Le dégagement d'SH2 se traduit par un noircissement plus ou moins intense du papier réactif.

Recherche des nitrites : Le germe est cultivé dans un bouillon VF contenant 1 % de nitrate de potassium pur. Lorsque la culture est développée, on ajoute successivement 1 ml du réactif A et 1 ml du réactif B de Griess.

Réactif de Griess A. :	Acide sulfanilique	0,5 g
	Acide acétique à 30 %	150 ml
Réactif de Griess B. :	αnaphtylamine	0,5 g
	Eau	50 ml

Porter à ébullition, décanter ,ajouter

	Acide acétique à 30 %	150 ml

Recherche de la Catalase : On verse dans une culture en bouillon quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 vol. La catalase produite par le microbe décompose l'eau oxygénée en oxygène gazeux.

C) L'Etude biochimique des souches et particulièrement des souches anaérobies a été faite par les techniques classiques décrites par Prévot et Tardieux. La détermination des acides volatiles de fermentation et de leur rapport réciproque a été systématiquement effectué par chromatographie unidimensionnelle (Strapatsaki, Cocovini). Les germes sont ensemencés dans un ballon de Jaubert et Gory glucosé à 10 ‰. Après dix jours à 37°, le bouillon de culture est centrifugé afin de recueillir 100 ml de liquide surnageant. Le pH est amené à 3 à l'aide d'acide tartrique à 40 %. Il est effectué un entraînement à la vapeur d'eau afin de recueillir dans de la soude N/100, 20 ml de distillat. Cette solution est concentrée sous vide jusqu'à un volume d'environ 4 ml.

A ces 4 ml, il est ajouté 0,7 g de permutite régénérée. Au bout de 5 minutes la solution est filtrée sur coton de verre et neutralisée par quelques gouttes de morpholine N. On dépose à l'aide d'une micropipette 5 mm3, 10 mm3, 15 mm3 et 20 mm3 sur papier Whatmann n° 2.

Le solvant utilisé pour cette chromatographie est le suivant :

Butanol	180 ml
Cyclohexane	180 ml
Propane-diol 1,2	60 ml
NH3 à 22°	4,2 ml
Morpholine	0,42 ml
Eau distillée	21 ml

Après un séjour de 12 heures à 20° le chromatogramme est révélé par pulvérisation d'une solution répondant à la formule suivante :

— 3/4 solution A diluée au 1/5 ;
— 1/4 solution B.

Solution A :	o. crésol-sulfone-phtaléine	0,2 g
	Eau distillée	15 ml
	NAOH N	0,3 ml
Solution B :	Véronal sodique	10 g
	Eau distillée	100 ml
	Alcool à 96°	150 ml

Caractères bactériologiques des souches de corynebacterium étudiées

	Physiologie	Dimensions (μ)	Catalase	θ optima (°C)	Pigment	Gélatine	Lait	Nitrites	Indol	Glucose	Galactose	Amidon	Mannose	Rhamnose	Levulose	Saccharose	Glycerine	Xylose	Sorbitol	Lactose	Maltose	Inuline	Arabinose	Dextrine	Dulcitol	Raffinose	Rouge neutre	Amines	Alcools	Aldehydes	Cetones	Acetoine	Cresol, scatol	SH2	NH3 (g/litre)	Acidité volatile (g/litre)	Type fermentaire	Acides fixes
C.hofmanni	A	I	+	37	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	+	-	-	0,65	0,48	A	0
C.parvum(I333I)	M	I,5	+	37	0	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	0,20	2,50	P/A	lact
C.bovis(I5039)	Af	2	+	37	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	0,30	A	0
C.equi(Ca I)	A	I,5	+	28	rose jaune	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,25	A	lact
C.renale cuniculi	M	I	+	37	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,25	0,66	A/P	lact
C.La 8I(≠ equi)	A	2	+	28	rose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38	0,26	A	0
C.xerose	A	I,5	+	37	0	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	0,25	0,25	A	lact
C.cutis commune	A	2	+	37	0	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,AI	0,30	A	0
C.D2k(minutissimum)	A	I,5	+	37	0	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	+	-	-	0,5I	0,77	A/B	lact
C.lymphophilum(488)	As	I	+	37	0	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,38	I,85	P/A	lact
C.humiferum(SIII)	A	2,5	+	28	jaune	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,52	A/B	lact
C.T2(≠humiferum)	A	2,5	+	28	jaune	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	0,54	A/B	lact
C.diphteroides	As	2,5	-	37	0	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	0,58	6,78	P/A	lact
C.B2(≠ diphteroides)	M	I,5	+	37	0	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	0,50	3,90	P/A	lact
C.85(≠ diphteroides)	M	2,5	-	37	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0,6I	3,50	A	lact
C.rathayi	A	I,5	+	28	jaune	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38	0,65	A	lact
C.michiganense	A	I	+	25	jaune	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,73	A	lact
C.fascians	A	I,5	+	28	creme	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,32	0,59	A	lact
C.hoaggi(I3255)	A	2	+	35	0	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38	I,50	A/P	lact
C.avidum(I2590)	As	2	-	37	rose	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0,65	5,00	P/A	lact
C.liquefaciens(II2)	As	2	+	37	rose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	0,28	2,80	P/A	lact
C.anaerobium	M	2	+	37	rose	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	---	-	-	0,39	3,I5	P/A	lact
C.granulosum(I3480)	M	2	+	37	rose	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	0,3I	2,60	P/A	lact
C.enzymicum(48 B)	Af	I,5	+	37	jaune	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0,30	I,45	P/A	lact
C.pseudotuberculosi (2451)	Af	2	+	37	creme	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	0,4I	2,30	P/A	lact
C.phocae(I3480 A)	Af	2	-	30	0	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	2,40	P/A	lact
C.pyogenes	M	I,5	-	37	0	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0,45	2,I0	P/A	lact
C.acnes	M	I,5	+	37	rose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	0,6I	3,80	P/A	lact
C.diphteriae	Af	2,5	+	35	0	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	t	+	-	-	-	0,42	0,80	A/P	lact
C.sepedonicum	A	I,5	+	22	0	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,3I	0,85	A	lact
C.I5133(≠annamensis)	Af	2	+	37	0	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,30	0,59	A/P	lact
C.I5355(≠granulomatis)	Af	3	+	35	jaune	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	I,65	A/P	lact
C.kutscheri	A	2	+	37	jaune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,45	A	lact
C.renale	A	2	+	37	0	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,34	0,98	A/P	lact
C.I2450(≠hepatodystrophicans)	M	2,5	+	37	0	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	0,39	I,78	P/A	lact

Caractères généraux des espèces du genre corynebacterium

Certains caractères généraux se dégagent de l'étude de ces souches.

MORPHOLOGIE.

Il s'agit exclusivement de bâtonnets asporulés *immobiles*, aciliés gram positifs.

Nous pouvons décrire les types suivants :

— Bacilles simplement droits et renflés à une extrémité, leurs dimensions sont de l'ordre de 3 µ/0,5 µ.
— Bacilles de forme longue, ramifiés ou filamenteux, pouvant présenter des renflements en massues. De tailles de 3 à 5 µ sur 0,5 µ.
— Bacilles courts presque cocciformes, associés en chaînettes ou amas plus ou moins importants, de dimensions inférieures à 2 µ.

Dans tous les cas, ils présentent des granulations métachromatiques au nombre de deux à quatre, facilement mises en évidence par la coloration d'ALBERT.

Leur groupement en culture est identique à celui des Actinomycetaceae en général : forme en palissade ou en amas enchevêtrés avec des formes libres en L.V.

Dans la majorité des cas, nos souches ont gardé après de nombreux repiquages un même aspect morphologique. Néanmoins, certaines ont varié dans leurs tailles et dans leurs formes (mais surtout dans leurs tailles).

Ces variations morphologiques accompagnent le plus souvent l'évolution du type respiratoire (bien que les cultures soient toujours faites dans le même milieu et dans les mêmes conditions).

Ces cas sont, cependant des exceptions, et il semble que le critère morphologique, bien que notoirement insuffisant pour un diagnostic d'espèces, puisse orienter de façon certaine vers un diagnostic de genre. En effet, chaque fois qu'une souche présentait dans son

cycle de développement, des dimensions supérieures à 5-6 μ (malgré des variations ultérieures), il s'est avéré qu'il ne s'agissait pas d'un Corynebacterium mais le plus souvent d'un Actinobacterium.

La biométrie qui d'après PRÉVOT permet de séparer les genres Corynebacterium, Actinobacterium, Bifidibacterium et Propionibacterium semble être un excellent critère.

CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

Nutrition :

Toutes les espèces cultivent sur milieu VF glucosé à 2 ‰ mais, dans de nombreux cas, la croissance au départ est nettement accélérée par l'addition de facteurs supplémentaires apportés soit par du sérum, soit par de l'extrait globulaire. Nous avons néanmoins observé que pour certaines souches l'addition au milieu de sérum humain était contre indiquée. Ces souches sont agglutinées par le sérum humain normal (souvent à des taux assez forts pouvant varier du 1/80e au 1/160e). Elles sont d'origine humaine, isolées soit de la peau ou des muqueuses, soit du plasma. En particulier la souche 83473 identifiée à C acnes est inhibée entièrement par quelques ml de sérum ajoutées à 150 ml de bouillon VF.

D'autres souches, d'origine végétale, sont agglutinées et leur pousse inhibée par l'addition de sérum de cheval.

A l'isolement des souches, leur culture permet de distinguer deux groupes :

— d'une part, les souches *aérobies*, le plus souvent d'origine végétale qui ne posent aucun problème particulier et qui toutes se développent, même sur gélose ordinaire, en 24/48 heures à l'exception de certaines souches, d'origine humaine, dont la croissance est plus lente ;

— d'autre part, les souches *microaérophiles*, d'origine humaine ou animale, à culture délicate. Il faut attendre souvent une semaine de culture à 37° pour obtenir une pousse convenable.

L'optimum de pH est compris entre 7 et 7,5.

Conditions thermiques de développement :

La majorité de nos souches ont une température optima de croissance voisine de 37° C. Cependant, toutes les souches d'origine végétale, celles isolées du sol, et quelques-unes d'origine animale, présentent leur optimum thermique aux environs de 25 et 28° C. Il est même parfois possible d'obtenir une pousse appréciable aux environs de 4° C, pour quelques souches d'origine végétale (c'est le cas en particulier des souches S III, Ca 1). S III, isolée à partir de la peau humaine, mais incontestablement d'origine végétale puisqu'elle fut identifiée à une variété de Corynebacterium humiferum pré-

sente encore une croissance à + 1° C. Maintenue à + 1° C pendant un an, elle donna une culture en 24 heures, dès le premier repiquage.

Il paraît donc que les souches d'origine végétale poussent sur gélose ordinaire avec un grand rendement, s'adaptent aisément aux conditions thermiques et présentent une longévité remarquable, ce qui les opposent de façon très nette aux souches d'origine humaine microaérophiles pour la plupart à gamme thermique peu étendue et à croissance difficile même dans des milieux complexes et hautement nutritifs.

Caractères des cultures :

Ici encore une opposition nette entre les souches d'origine végétale et les souches d'origine humaine et animale. L'aspect des colonis dans les tubes de gélose profonde est particulièrement variée pour les souches microaérophiles d'origine humaine :

— certaines sont lenticulaires complexes ;
— d'autres irrégulières et mamelonnées ;
— quelques-unes enfin très petites et floconneuses.

Elles peuvent atteindre 2 m/m après 8 à 10 jours de culture à la température optima. Mais le caractère lenticulaire ou mamelonné n'est pas un caractère différentiel car il peut exister pour une même souche des variations imprévisibles du type colonial.

Les cultures faites sur la pente de la gélose inclinée sous vide donnent des colonies du type « Smooth », petites et généralement non pigmentées. Cependant un certain nombre d'espèces sont pigmentées en rose saumon, c'est le cas de Corynebacterium acnes, avidum, liquefaciens, anaerobium, granulosum et de la souche 12756.

En milieu liquide ces mêmes souches, en tubes scellés sous vide, donnent soit une pousse en grumeaux, avec liquide clair surnageant, soit un trouble homogène. Mais elles ne poussent jamais en grumeaux compacts, difficiles à dilacérer ; ce caractère étant surtout rencontré chez les Actinobacterium.

Les espèces aérobies sur milieu de Clauberg présentent des colonies du type Y. de Welsch.

A l'opposé, le type colonial des souches d'origine végétale est beaucoup plus homogène. Les colonies sont généralement grosses, muqueuses, lisses et très fortement pigmentées. Le pigment le plus plus fréquent est jaune, parfois rose crème, non diffusible. Plus rarement, l'aspect des cultures sur gelose : granuleux, irrégulier et adhérent, rappelle les Mycobacteriaceae, c'est le cas de Corynebacterium fascians et de la souche 13112.

Pouvoir glucidolytique :

Nous insisterons encore sur le fait que la recherche du pouvoir glucidolytique doit toujours s'effectuer dans les mêmes conditions. La lecture du virage de l'indicateur ou du pH terminal devra être

réalisée à la fin de la phase exponentielle de croissance. Ce temps est variable mais doit être établi pour chaque souche avant le test.

De très nombreux résultats sont trop souvent imprécis (oses fermentés : ± ou positifs tardifs et nous avons vérifié que dans ces cas la réponse est toujours négative).

Par exemple :

		Résultats personnels
Corynebacterium acnes :	lactose + ou — (Hauduroy)	Négatif
	saccharose + ou — (Hauduroy)	Négatif
	saccharose (lent) (Bergey)	Négatif
	Dextrine + ou — (Hauduroy)	Négatif

Nous avons ainsi noté certaines différences entre le pouvoir glucidolytique de divers Corynebacterium tels qu'ils sont décrits dans les clés de détermination et les fermentations que nous avons constatées avec nos souches de références.

Nous avons suivi pendant 3 ans, pour certaines d'entre elles le pouvoir glucidolytique, il n'y a jamais eu aucune variation dans la lecture de ce test. Il semble donc que la possibilité d'apparition d'enzymes adaptatifs soit nulle en opérant dans les mêmes conditions.

La comparaison de nos 60 souches fait ressortir vis-à-vis de ce test la relative homogénéité du genre Corynebacterium. A l'exception de quelques espèces dont le pouvoir glucidolytique est nul, tous les Corynebacterium font fermenter régulièrement le glucose, le levulose et le galactose, et à un degré moindre le xylose, le maltose, le mannose, la glycérine, l'amidon et la dextrine.

Pour les espèces fermentatives, tous ces glucides peuvent être attaqués quel que soit le type respiratoire, aérobie ou microaérophile des souches. L'attaque du lévulose est particulièrement nette et importante et c'est avec ce substrat que l'on obtient la plus forte acidification du milieu (pH 4). Par contre le lactose n'est généralement pas fermenté.

Si le pouvoir glucidolytique est un critère insuffisant pour la détermination de l'espèce, il permet donc à l'intérieur du genre Corynebacterium de définir des groupes homogènes réunissant des espèces manifestant vis-à-vis des glucides une action constante.

Action sur le lait :

La coagulation du lait sera notée positive si elle intervient rapidement (dans les limites de temps correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance). Toutefois, certaines de nos souches présentent une coagulation tardive (au bout d'une dizaine de jours, mais, dans ce cas, nous ne considérons pas le test comme positif).

En effet, 22 souches sur 60 coagulent le lait (dans la proportion de 17 souches microaérophiles et 5 aérobies). Une étude comparée

de ces souches, portant sur trois ans, nous a montré que le caractère positif est toujours demeuré constant dans le cas des positifs rapides alors que les positifs lents pouvaient parfois devenir négatifs. L'inconstance de ce dernier caractère nous a conduit à l'éliminer des clefs de détermination.

Le caillot formé est partiellement digéré pour quelques souches après 15 jours. Mais ce caractère est trop rare pour servir utilement.

Pouvoir protéolytique :

1° *Sur la gélatine* : la liquéfaction de la gélatine se produit pour 15 souches sur 60 (dans la proportion de 12 souches microaérophiles et 3 souches aérobies). Elle est d'ailleurs lente, 8 jours en moyenne, mais ce critère est également constant.

2° *Sur les cubes de sérum et de blancs d'œufs en tubes d'Yvan* HALL aucune souche ne liquifie en milieu VF glucosé à 2 ‰ les cubes de sérum et de blanc d'œuf.

En somme, à part quelques-unes qui digèrent très lentement et partiellement le caillot de lait la majorité de nos souches ne présentent qu'un faible pouvoir protéolytique.

Réduction des nitrates :

32 souches sur 60 réduisent les nitrates en nitrites en présence principalement du glucose, lévulose ou galactose (dans la proportion de 15 souches microaérophiles et 17 souches aérobies). Ce caractère de positivité est également un excellent critère du fait de sa constance.

Thermorésistance :

Toutes les espèces étudiées sont détruites en dix minutes à 60° C. Certaines d'entre elles sont tuées pour des températures inférieures à 60° C. La thermorésistance du genre Corynebacterium est donc pratiquement nulle.

Longévité :

Leur longévité est très courte, environ un mois à la température du laboratoire ; quelques souches ont une longévité plus courte encore, de l'ordre de 15 jours. Seules les espèces pigmentées ont une longévité supérieure à un an.

LE TYPE RESPIRATOIRE :

La majorité de nos souches présente des types respiratoires nets mais très divers :

Type I - Anaérobie strict	5	souches
Type II - Microaérophile	20	»
Type III - Zone alternante	1	»
Type IV - Zone critique	2	»
Type VI - Anaérobie facultatif	8	»
Type VII - Aérobie strict	21	»
	57/60	»

Certaines d'entre elles ont une croissance en gélose profonde qui ne concorde avec aucun des schémas de la classification de Frei, si bien que l'interprétation de ces types est délicate.

Dans un premier cas, on constate l'existence d'une croissance microaérophile mais il existe quelques colonies réparties à la surface de la zone aérobie. Cette souche se comporte d'ailleurs comme une anaérobie, sa culture n'est appréciable que dans des milieux régénérés et sa croissance sur gélose inclinée même pour les colonies de surface est extrêmement réduite (souche C 13967 identifiée à C. diphtéroïdes).

Dans un deuxième cas, la croissance est strictement limitée à la zone microaérophile et on ne constate la présence de colonie ni dans la zone aérobie ni dans la profondeur de la gélose (souche 13255 identifiée à C. hoagii).

Dans un troisième cas enfin, l'aspect est voisin du précédent mais quelques colonies apparaissent dans la zone aérobie (souche C 14185 identifiée à C. xerose).

Ces deux derniers types s'ils cultivent parfaitement dans des milieux désaérés présentent néanmoins une croissance appréciable en gélose inclinée. Il est d'ailleurs remarquable que pour chacune de ces souches les colonies prélevées dans les différentes zones de croissance donnent par repiquage le même type respiratoire.

En résumé, il est possible de définir trois grands groupes de corynebacteries tout au moins à l'isolement :

— des microaérophiles qui ne présentent une croissance appréciable qu'en milieux strictement anaérobies ;

— des aérobies stricts qui n'ont aucune tendance à pousser dans la profondeur de la gélose ;

— de nombreux types intermédiaires dont on a l'impression qu'ils pourraient dériver les uns des autres et qui tous présentent au bout de quelques repiquages une évolution marquée vers l'aérobiose.

Cette multiplicité des types respiratoires fait donc penser à une évolution constante de ce caractère chez les corynebactéries car il est exceptionnel qu'une souche conserve un type respiratoire stable et dans la majorité des cas on constate des variations progressives ou brutale. Il s'agit toujours de souches microaérophiles à l'isolement qui évoluent vers l'aérobiose.

Il faut noter cependant que l'instabilité de ce type respiratoire peut être corrigée par certains artifices. C'est ainsi que le passage de certaines souches de Corynebacterium qui se comportaient alors comme anaérobies facultatives, dans du plasma ou du sérum, entraînent au bout de 18 à 24 heures une réversion du type respiratoire vers la microaérophilie.

La recherche de la catalase a été effectuée dès l'isolement des

souches. L'activité enzymatique est constante et d'autant plus prononcée que le type respiratoire est plus proche de l'aérobiose.

L'étude de 35 souches (microaérophiles, anaérobies facultatives ou anaérobies strictes) donne les résultats suivants :

— Sur 22 souches microaérophiles, 21 sont + (C. pyogènes —) ;
— Sur 8 souches anaérobies facultatives 7 sont + (13480 —) ;
— Sur 5 souches anaérobies strictes 5 sont —, ce sont :

- Corynebacterium diphteroides.
- S. 13645 (identifiée à C. pyogenes).
- Corynebacterium avidum.
- S. 12590 (identifiée à C. avidum).
- S. 12756 (identifiée à C. pyogenes).

Pour les types microaérophiles l'activité catalasique présente d'importantes variations que nous avons étudiées avec quelque précision. Deux de nos souches, par exemple, ont une survie de l'ordre de 3 heures en présence d'une concentration d'eau oxygénée de 0 ml 5 pour 10 ml de culture. Une autre souche résiste pendant deux heures à une concentration identique. Par contre, certaines autres ne survivent que pendant une demi-heure en présence de concentrations deux fois plus faibles d'eau oxygénée.

Il existe donc pour des souches bactériennes qui présentent le même type respiratoire des différences extrêmement nettes dans l'activité de la catalase.

L'ensemble de ces résultats ne fait que confirmer l'évolution générale du genre Corynebacterium vers l'aérobiose. Cette instabilité est un caractère intéressant pour l'identification du genre.

Mais à l'intérieur du genre Corynebacterium, il ne semble pas possible de définir des groupes par le type respiratoire car les souches demeurant constantes et stables sont exceptionnelles (C. 8384 - C. Diphteriae).

CARACTERES BIOCHIMIQUES

Acidité volatile totale - Type fermentaire :

L'acidité volatile et le type fermentaire varient en fonction du type respiratoire. Nous avons étudié systématiquement ces caractères sur toutes nos souches, même pour les souches aérobies (cultivées sur milieux VF glucosés et aérés), afin d'obtenir des points de comparaison et interpréter si possible les différents types rencontrés.

— *Les souches aérobies* y compris Corynebacterium pseudodiphtéricum et Corynebacterium xerose, que nous avons pris comme références présentent au bout de 10 jours de culture une faible acidité volatile (de l'ordre de 0,300 à 0,800 gramme exprimé en

acide acétique par litre de culture). Les souches isolées du sol ont également une acidité faible :

— 0 g 260 pour T La 81 ;
— 0 g 310 pour Ca 2 (identifiée à Corynebacterium humiferum) ;
— 0 g 730 pour C. Michiganense ;
— 0 g 650 pour C. rathayi ;
— 0 g 850 pour Corynebacterium sepedonicum.

Les souches du type IV qui sont généralement d'origine cutanée présentent des taux d'acidité plus élevés :

— 0,850 pour M S C 1 (identifiée à Corynebacterium minutissimum) ;
— 0,770 pour D 2K (identifiée à Corynebacterium minutissimum) ;
— 1 g 300 pour la souche 14185 (identifiée à Corynebacterium xerose) ;
— 1 g 500 pour la souche 13255 (identifiée à Corynebacterium hoagii).

Ces taux élevés permettent de penser que les souches aérobies d'origine cutanée ont évolué à partir d'un type respiratoire microaérophile, ce qui correspond bien au type de croissance obtenue en gélose profonde dès leur isolement.

Le type fermentaire est acétique/butyrique pour 4 souches, la proportion de ces deux acides est de 3/1. Toutes les autres souches aérobies ont un type fermentaire acétique pur.

— *Les souches microaérophiles* produisent une acidité volatile beaucoup plus forte qui peut varier de 1 g 500 à 6 g par litre. A un premier examen deux groupes semblaient devoir être individualisé, d'une part les souches dont l'acidité était de l'ordre de 1 g 500 à 2 g par litre et d'autre part les souches qui produisent une acidité beaucoup plus forte de l'ordre de 3 à 6 g par litre.

En réalité ces types ne sont pas stables comme nous avons pu nous en assurer par des dosages biochimiques effectués systématiquement sur un trentaine de nos souches en respectant toujours les mêmes conditions expérimentales. On constate alors que le taux d'acidité est extrêmement variable d'une expérience à l'autre. En voici quelques exemples :

	Avril 59	Octobre 60	Février 61
8384 (C. acnes)	3 g 500	5 g 100	1 g 700
51 (C. diphteroïdes) . ..	1 g 900	0 g 860	2 g 800
C. pyogenes	1 g 620	2 g 100	3 g 200
3 L' (C. diphteroïdes) ..	1 g 800	3 g 400	1 g 000

Là encore, il est possible d'expliquer ces variations par l'instabilité des types respiratoires des espèces étudiées.

Le type fermentaire de toutes ces souches est propionique-acétique dominant. Certaines espèces cependant sont acétique pur (souche 85). D'autres, présentent un troisième acide volatile, l'acide valérianique, en petite quantité. C'est le cas des souches 8384, 83473 identifiées à Corynebacterium acnes.

La proportion des deux acides, propionique et acétique est variable d'une souche à l'autre : 17 souches sur 60 ont un rapport P/A compris entre 3 et 2, 6 un rapport égal à 1, 9 un rapport de 1/2 à 1/3.

Si le type fermentaire est intéressant à considérer, la proportion des différents acides volatiles de fermentation ne peut permettre un classification même grossière des souches, puisque nous venons de voir à quel point cette proportion est variable. Cette variation est d'ailleurs fonction de l'âge de la culture si bien qu'il est difficile d'obtenir des comparaisons valables entre des souches fraîchement isolées et des souches conservées au laboratoire par lyophilisation.

Distillat alcalin :

Parmi les autres produits du métabolisme qui sont recherchés sur le distillat alcalin nous avons pu mettre en évidence des amines dans la proportion de 19 cas sur 60, il s'agit en général de souches microaérophiles (18 souches) et dans un seul cas d'une souche anaérobie facultative (Corynebacterium diphteriae).

On rencontre également de l'alcool à l'état de traces et des aldéhydes (36 cas sur 60). Les souches microaérophiles paraissent produire plus fréquemment des aldéhydes que les souches aérobies (22 cas positifs pour les souches microaérophiles, 14 cas positifs pour les souches aérobies).

On peut déceler enfin de l'acétone ce qui est assez rare puisque 9 souches sur 60 seulement présentent ce caractère.

On ne peut mettre en évidence ni phénol, ni scatol, ni crésol.

Pouvoir indologène :

Le pouvoir indologène est assez fréquent chez les Corynebacterium (22 souches sur 60). Ce caractère est d'ailleurs remarquablement stable car, pour une espèce indol positif, on le met constamment en évidence quelque soit l'âge de la souche et les modalités de sa conservation.

Production d'ammoniaque :

Signalons enfin que la recherche de l'ammoniaque et son dosage par la méthode de Foremann donne des chiffres peu significatifs. Ils sont généralement proportionnels à l'acidité volatile de la souche envisagée.

Production d'acétyl-méthyl-carbinol :

L'acétyl-méthyl-carbinol n'est que rarement produit (10 souches sur 60), il s'agit d'ailleurs surtout de souches microaérophiles.

Production d'hydrogène sulfuré :

L'hydrogène sulfuré est retrouvé dans 12 cas sur 60 et principalement pour les souches microaérophiles (9 cas sur 12). Comme le pouvoir indologène ce caractère demeure constant et mérite donc de rentrer dans les clés de détermination.

Enfin la plupart de nos souches de Corynebacterium, 58 cas sur 60 produisent de l'acide lactique.

En résumé, les caractères biochimiques des Corynebacterium qui peuvent servir à la détermination des espèces sont peu nombreux. Les seuls qui nous ont paru intéressants par leur constance sont : la production d'indol et la production d'hydrogène sulfuré ; ce qui avec la coagulation du lait, la liquéfaction de la gélatine et la réduction de nitrates dont nous avons précédemment souligné l'importance, conduit à 5 caractères fondamentaux qui doivent à notre sens servir dans les clés de détermination.

POUVOIR PATHOGENE

Toutes les recherches que nous avons pu effectuer sur le pouvoir pathogène de nos souches sont restées négatives. Nous n'avons pu produire aucune lésion, ni locale, ni générale, par quelque mode d'inoculation que ce soit : injection sous-cutanée, intra-péritonéale ou intraveineuse. Il n'est pas possible de retrouver les bactéries ni au point d'inoculation, ni dans le sang, ni dans les viscères.

Si quelques-unes de nos souches étaient des saprophytes évidents, certaines d'entre elles néanmoins avaient présenté un caractère pathogène net pour l'homme (il s'agit en particulier de nos souches de collection). Il faut donc penser avec Prévot que le pouvoir pathogène quand il existe disparaît très rapidement par repiquage si bien qu'il devient pratiquement impossible de reproduire une infection expérimentale.

Clé de détermination

L'étude systématique qui vient d'être faite nous a conduit à établir une clé de détermination pour les différents types de Corynebacterium étudiés.

Il nous a paru possible, en effet, d'une part de définir de manière stricte le genre lui-même et d'autre part de créer à l'intérieur de ce genre de grands groupes qui réunissent des espèces extrêmement voisines par leurs caractères bactériologiques, physiologiques et biochimiques.

DEFINITION DU GENRE

Le genre Corynebacterium est défini par des caractères morphologiques. Ils ont été précédemment envisagés mais il nous semble nécessaire d'insister sur quelques points.

Si les Corynebacterium sont des bactéries très polymorphes et qui en culture âgée présentent fréquemment des formes d'involution caractéristiques, il nous semble que les pseudo-ramifications sont extrêmement rares dans ce groupe et que si elles existent de manière prépondérante on a à faire à des groupes voisins et particulièrement à des Actinobacterium (c'est en particulier le cas de la souche 73).

Les variations de taille bien que classiquement admises, en particulier pour Corynebacterium diphteriae ne sont comprises que dans certaines limites de 2 à 4 μ et que dès lors les constatations de Prévot qui insiste sur l'importance de la biométrie dans l'étude de ces groupes nous paraissent d'une très grande valeur.

Toutes les souches de Corynebacterium que nous avons pu étudier sont immobiles, et nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence de cils par des colorations appropriées. Ce caractère d'immobilité nous paraît donc particulièrement important dans la définition du genre. Il permet d'éliminer avec certitude, certaines espèces qui dans la classification de Bergey, sont indûment classées parmi les Corynebacterium, c'est le cas de : Corynebacterium hypertrophicans, Corynebacterium poinsettiae, Corynebacterium tritici et

de Corynebacterium flaccumfaciens, que BERGEY appelle d'ailleurs aussi « Pseudomonas ».

Le genre peut d'autre part être défini par des caractères biochimiques ou enzymatiques. C'est tout d'abord la nature du type fermentaire propionique-acétique dominant, c'est ensuite la fermentation de certains sucres.

En effet, à quelques exceptions près qui définissent d'ailleurs un groupe à part, les Corynebacterium quels que soient leurs types respiratoires présentent un pouvoir fermentatif constant vis-à-vis du glucose, du lévulose et du galactose.

Par contre, les fermentations de l'arabinose, du saccharose et du lactose sont inconstantes et n'existent que pour certaines souches. Mais ces caractères sont importants puisqu'ils sont toujours soit présents, soit absents pour une souche donnée. Ces résultats ainsi que la constance des réponses enzymatiques que nous avons toujours obtenues avec nos souches nous ont conduit à penser qu'une clé de détermination des Corynebacterium devait être fondée sur le pouvoir fermentatif des différentes espèces vis-à-vis de 6 substances glucidiques : glucose, lévulose, galactose, arabinose, saccharose et lactose.

Dans les groupes ainsi constitués, par leurs zymogrammes, des caractères secondaires permettent de pousser plus loin la différenciation.

Il s'agit tout d'abord du type respiratoire soit aérobie, soit anaérobie avec une prédominance marquée de la microaérophilie. Mais en raison de la fréquence aérobisation des souches ce caractère n'a de valeur diagnostique que si il est recherché dès l'isolement.

La nature du type respiratoire doit être mise en relation avec le pouvoir indologène. Nous avons constaté en effet que les souches aérobies ne produisent généralement pas d'indol et que par contre les souches microaérophiles ainsi que les souches anaérobies facultatives possèdent un pouvoir indologène net. Nous avons déjà signalé ce fait dans un travail antérieur, on constate néanmoins quelques exceptions, c'est en particulier le cas des souches 51 et 3 L' identifiées à C. diphteroïdes mais dans ces cas il semble bien que la disparition ou l'absence de pouvoir indologène est une conséquence de l'aérobisation.

Nous n'avons jusqu'ici rencontré aucune différence significative entre les souches classées dans un même groupe quels que soient leurs biotopes d'origine. Mais les températures optima de croissance permettent d'obtenir cette distinction puisqu'elle paraît bien correspondre à l'origine des souches.

C'est ainsi que les souches d'origine humaine ont une température optima de croissance voisine de 37°, par contre les souches isolées du sol ou provenant de corynébactérioses végétales ont un optimum thermique voisin de 28°. Quelques exceptions sont cependant signalées, il s'agit généralement de souches d'origine animale

qui poussent à 28° mais qui émanent semble-t-il d'animaux à sang froid.

Indépendamment de la température optima de croissance, la pigmentation joue un rôle dans le diagnostique différentiel écologique. Pratiquement la plupart des souches d'origine animale ou humaine présentent une pigmentation rose saumon plus ou moins prononcée (c'est particulièrement le cas de Corynebacterium acnes). Les souches émanant du sol présentent elles une pigmentation constante jaune à jaune orangé. Nous avons même remarqué que certaines d'entre elles présentaient un type de culture en gélose qui rappelle certaines mycobactéries saprophytes du type Mycobacterium phlei. Il y a là vraisemblablement un caractère intéressant qui permettrait de rapprocher ces souches du groupe des Mycobactéria.

Signalons enfin que toutes les souches d'origine végétales sont aérobies et que l'on ne distingue pas pour ce groupe écologique la multiplicité des types respiratoires que nous avions envisagés pour les espèces d'origine animale ou humaine.

A l'intérieur des grands groupes ainsi constitués, les caractères secondaires tels que la production d'hydrogène sulfuré, l'action sur la gélatine ou l'action sur les nitrates permettent d'obtenir des distinctions secondaires.

La combinaison des différents tests que nous venons d'énumérer est extrêmement variable, nous insisterons cependant sur le fait que pour l'ensemble de nos souches, que nous suivons depuis plus de deux ans, ces caractères se sont révélés constants et qu'ils paraissent donc pouvoir être employés dans une clé de détermination telle que celle que nous donnons ci-dessous.

CLE DE DETERMINATION

FAMILLE DES ACTINOMYCETACEAE

Genre Cornybacterium

Bâtonnets *immobiles*, *aciliés*, *asporulés*, gram positif, présentant *constamment des granulations métachromatiques*, fréquemment des *formes d'involution*, rarement quelques fausses ramifications.

Polymorphes mais *de taille toujours inférieure à* 3-4 μ.

Parfois pigmentés, pigment non diffusible rose ou jaune.

Aérobies mais *principalement microaérophiles.*

Le type fermentaire des microaérophiles est *presque exclusivement* : Propionique-acétique.

I. — Non glucidolytique.

II. — Glucose levulose galactose fermentés.

A - *Arabinose fermenté - lactose non fermenté*
- 1. - Saccharose fermenté
- 2. - Saccharose non fermenté.

B - *Arabinose non fermenté - Saccharose fermenté*
- 1. - Lactose fermenté
- 2. - Lactose non fermenté.

Il nous a été impossible d'étudier : C. insidiosum, C. murisepticum. C. phocae, C. enzymicum, C. striatum, C. nephridii, C. vesiculare, C. paurometabolum, C. bovis qui ne sont décrits que dans la classification de Bergey. Nous les avons cependant placés, dans notre clef de détermination d'après les descriptions données par M. H. Burkholder.

I. — NON GLUCIDOLYTIQUE

a) *Origine humaine.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

- Température optima de croissance..... 37°

— Non pigmenté

SH2 non produit

Lait non coagulé

Gélatine non liquéfiée

Nitrates réduits en nitrites

1 - *Corynebacterium pseudodiphtericum*

2 - Microaérophile - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites

2 - *Corynebacterium adamsoni*

3 - Microaérophile - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites

3 - *Corynebacterium parvum*
(quelques souches fermentent le glucose)

b) *Origine animale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites

4 - *Corynebacterium bovis*

• Température optima de croissance ..... 28°
— Non pigmenté
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites

5 - *Corynebacterium paurometabolum*

SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites

6 - *Corynebacterium nephredii*

— Pigmenté en rose jaunâtre
SH2 non produit

Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
7 - *Corynebacterium equi*

• Température de croissance ..... 20°
— Pigment orangé
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites
8 - *Corynebacterium vesiculare*

2 - Microaérophile - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits en nitrites
9 - *Corynebacterium renale cuniculi*

c) *Origine végétale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 28°
— Pigment rose
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
10 - *voisin de Corynebacterium equi*

SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
11 - *voisin de Corynebacterium equi*

II. — GLUCOSE - LEVULOSE - GALACTOSE fermentés

ARABINOSE fermenté - LACTOSE non fermenté

1° Saccharose fermenté

a) *Origine humaine.*

1 - Anaérobie strict - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
12 - *Corynebacterium diphteroïdes*

2 - Microaérophile - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
13 - *voisin de Corynebacterium diphteroïdes*

SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
14 - *voisin de Corynebacterium diphteroïdes*

b) *Origine végétale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène
• Température optima de croissance ..... 28°
— Pigment jaune
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
15 - *Corynebacterium rathayi*

SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
16 - *Corynebacterium michiganense*

— Pigment orangé
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
17 - *Corynebacterium fascians*

2° Saccharose non fermenté

a) *Origine humaine.*

1 - Anaérobie strict - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Pigment rose saumon
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates non réduits
18 - *voisin de Corynebacterium pyogènes*

2 - Microaérophile - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates non réduits
19 - *Corynebacterium pyogenes*

3 - Microaérophile - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Pigment rose saumon
SH2 produit
Lait coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
20 - *Corynebacterium acnes*

4 - Anaérobie facultatif - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté - Toxinogène
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
21 - *Corynebacterium diphteriae*

• Température optima de croissance ..... 30°-35°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
22 - *voisin de Corynebacterium diphteriae*
(mais non toxinogène)

b) *Origine végétale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima ..... 22°
— Non pigmenté

SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
23 - *Corynebacterium sepedonicum*

ARABINOSE non fermenté - SACCHAROSE fermenté

1° LACTOSE FERMENTÉ

a) *Origine humaine.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 30°
— Pigment rose
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
24 - *Corynebacterium Hoagii*

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
25 - *Corynebacterium striatum*

2 - Anaérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Pigment rose saumon
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates non réduits
26 - *Corynebacterium avidum*

3 - Anaérobie strict - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Pigment rose saumon
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
27 - *Corynebacterium liquefaciens*

4 - Microaérophile - Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°

— Pigment rose saumon
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
28 - *Corynebacterium anaerobium*

SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
29 - *Corynebacterium granulosum*

5 - Anaérobie facultatif

• Température optima de croissance ..... 37°
— Pigment jaune blanc
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
30 - *Corynebacterium enzymicum*

b) *Origine animale.*

1 - Anaérobie facultatif - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
31 - *Corynebacterium murisepticum*

SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
32 - *Corynebacterium phocae*

— Pigment crème orangé
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
33 - *Corynebacterium pseudotuberculosis*

— Pigment blanc jaunâtre
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée

Nitrates non réduits
34 - *Corynebacterium murium*

c) *Origine végétale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 23°
— Pigment jaune
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine liquéfiée
Nitrates non réduits
35 - *Corynebacterium insidiosum*

2° Lactose non fermenté

a) *Origine humaine.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
36 - *Corynebacterium xérose*

SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
37 - *Corynebacterium cutis commune*

2 - Microaérophile - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 37°
— Non pigmenté
SH2 non produit
Lait non coagulé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
38 - *Corynebacterium lymphophilum*

b) *Origine végétale.*

1 - Aérobie strict - non Indologène

• Température optima de croissance ..... 28°
— Pigment jaune
SH2 non produit
Lait non coagu lé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates réduits en nitrites
39 - *voisin de Corynebacterium humiferum*

— Pigment crème
SH2 non produit
Lait non coagu lé
Gélatine non liquéfiée
Nitrates non réduits
40 - *Corynebacterium humiferum*

Une telle clé détermination est-elle valable ?

Nous avons cherché si nos résultats étaient conformes à ceux obtenus par d'autres auteurs sur des souches de références. Nous remarquerons qu'à quelques exceptions près les données bactériologiques et biochimiques qui sont condensées dans nos clés de détermination sont conformes aux descriptions d'espèces données dans la littérature.

En particulier, Corynebacterium diphteriae, corynebacterium hofmanni, corynebacterium acnes, corynebacterium avidum, corynebacterium anaérobium, corynebacterium diphtéroïdes, corynebacterium xerose et corynebacterium cutis pour les souches d'origine humaine, corynebacterium michiganense, corynebacterium fascians, corynebacterium sepedonicum pour les souches d'origine végétale, correspondent pour la majorité de leurs caractères descriptifs à ceux que nous avons donnés. Néanmoins, nous constatons que certaines espèces particulièrement corynebacterium parvum et corynebacterium pyogenes, diffèrent sur quelques points, en particulier sur leur pouvoir fermentaire. Il est vrai que cette exception n'est pas uniquement de notre fait et que le pouvoir glucidolytique de ces deux espèces est diversement interprété par Hauduroy et Bergey d'une part qui estiment que ces espèces ne sont pas glucidolytiques et d'autre part par Prévot qui les décrit comme douées d'un pouvoir enzymatique net.

Bien que nous n'ayons pu faire cette étude par nous-mêmes, il semble bien que les caractères antigéniques des souches de Corynebacterium dans la mesure où elles ont été et pu être étudiées donnent des résultats qui concordent avec nos clés de description.

En effet, une étude sérologique des corynebactéries anaérobies faite par Linzenmeeir au service des anaérobies de l'Institut Pasteur, ainsi que des études voisines de Beerens et Lentze ont permis de conclure à la parenté antigénique de Corynebacterium avidum et Corynebacterium anaerobium d'une part, de Corynebacterium liquefaciens et Corynebacterium parvum d'autre part. Corynebacterium granulosum se situerait à part, et Corynebacterium diphteroïdes serait nettement différent sur le plan antigénique.

Cette conception est confirmée par les études de Caille et Joucas qui par hémagglutination reconnaissent deux grands types sérologiques dans ce groupe :

d'une part, Corynebacterium diphteroïdes et,
d'autre part, Corynebacterium acnes, Corynebacterium parvum,

Corynebacterium avidum, Corynebacterium granulosum, Corynebacterium anaerobium et Corynebacterium liquefasciens. La parenté antigénique entre ces dernières souches est encore soulignée par les travaux de Prévot et de Thouvenot qui étudièrent des souches de Corynebacterium anaérobies à l'aide du bactériophage 1452 du Corynebacterium parvum. La lysotypie démontre qu'il existe une relation certaine et étroite entre Corynebacterium parvum, Corynebacterium avidum, Corynebacterium anaerobium et Corynebacterium liquefasciens. Corynebacterium acnes s'éloigne déjà des groupes précédents, il en est de même de Corynebacterium pyogenes et surtout de Corynebacterium diphteroïdes pour lequel on ne constate aucune lyse bactériophagique dans les conditions expérimentales précédemment définies.

Ces groupes antigéniques concordent avec les groupes que nous avions faits sur le plan biochimique. Les quatre espèces que nous venons de signaler comme antigéniquement voisines sont en effet groupées sur un même tableau. Corynebacterium acnes, Corynebacterium pyogenes et surtout Corynebacterium diphteroïdes sont réunis eux aussi sur des tableaux de détermination distincts. Enfin, Corynebacterium lymphophilum qui est sans rapport antigénique avec les précédents se situe tout à fait à part dans notre classification.

DEUXIÈME PARTIE

Étude des acides désoxyribonucléiques

L'étude des acides désoxyribonucléiques des bactéries a permis au cours de ces dernières années d'obtenir une définition des genres en se basant sur la nature et la proportion des bases constitutives des A.D.N.

Le principe même de cette étude n'est d'ailleurs pas récent. La première expérience qui a montré l'importance des A.D.N. dans les événements mutationnels est celle de GRIFFICH en 1928. Pour la première fois, la mutation a pu être rattachée à l'existence d'une molécule organique déterminée et ultérieurement on a pu démontrer que les acides nucléiques sont les supports universels de l'information génétique. Cette découverte fut faite tout d'abord chez les bactéries par AVERY, Mc LEODE et Mc CARTHY en 1944, puis chez les virus par HERCHEY, CHASE en 1942.

La détermination de la structure moléculaire de l'A.D.N. par WATSON et CRICK en 1953 a conduit à envisager le problème de l'information génétique en termes de structure moléculaire. Il s'agissait de déterminer comment l'information contenue dans l'échelle polynucléotidique pouvait être transmise. Ces études sont encore en cours mais on sait déjà tout le développement qu'on pu leur donner les généticiens en particulier WOLLMAN et JACOB pour l'Ecole française.

Si l'A.D.N. commande l'information génétique et donc le devenir de la cellule microbienne il était séduisant de chercher à priori dans la structure de cet acide la définition biochimique des groupes bactériens et peut-être des espèces. Cette étude a été faite par KI-YONG-LEE, WAHI et BARBU. Ces auteurs ont montré que les bases constitutives de l'A.D.N. : bases puriques, guanine et adénine et bases pyrimidiques, cytosine et thymine ou plus exactement leurs

proportions réciproques permettent de caractériser les différents genres microbiens.

L'A.D.N. représente en effet trois à quatre pour cent du poids sec des bactéries et la polymérisation de cet acide fait qu'il doit exister des combinaisons extrêmement nombreuses et peut-être aussi nombreuses que les espèces elles-mêmes.

Mais jusqu'ici, il ne paraît pas à notre connaissance que des groupes bactériens aient été étudiés dans leur ensemble. Les différents auteurs qui se sont jusqu'ici préoccupés de cette question se sont contentés, pour démontrer l'intérêt de leur découverte, d'étudier quelques espèces réparties dans des genres très différents de la systématique.

Il nous a semblé que ces recherches devaient être complétées car les techniques d'extraction de l'A.D.N., les techniques d'hydrolyse de cet acide ainsi que les méthodes de dosages spectro-photométriques des bases constitutives sont actuellement assez fines pour que nous puissions espérer déceler des différences significatives entre espèces ou groupes d'espèces qui viendraient étayer les données bactériologiques classiques. C'est pour cette raison que la constitution des acides désoxyribonucléiques a été systématiquement étudiée chez toutes les espèces de Corynebacterium dont nous avons pu disposer. Il nous semble actuellement que cette méthode, si elle est suffisamment perfectionnée pourra conduire les bactériologistes à concevoir des rapports entre espèces fondés sur une réalité biochimique indiscutable.

La deuxième partie de ce travail traitera donc de cette question et nous comparerons finalement les résultats obtenus quant à la structure des acides désoxyribonucléiques des différentes espèces, avec les groupes que nous avons pu définir dans les clés de détermiantion précédentes.

Dosage des bases puriques et pyrimidiques

Détermination du rapport $\frac{\text{Adénine + Thymine}}{\text{Guanine + Cytosine}}$

Cette détermination s'effectue en quatre étapes, sur les corps microbiens préalablement lavés :

— Extraction de l'A.D.N. à partir des cellules bactériennes ;
— Hydrolyse de l'A.D.N. extrait ;
— Séparation chromatographique des bases puriques et pyrimidiques ;
— Dosage spectrophotométrique de ces bases et détermination du rapport.

La difficulté de ce dosage réside surtout dans les deux premiers temps : extraction et hydrolyse de l'A.D.N. La lyse des corps microbiens est particulièrement délicate, or cette phase est primordiale puisqu'elle conduit à l'obtention des constituants cellulaires libres ou tout au moins aisément dissociables et permet l'extraction de la quasi totalité de l'A.D.N.

Un rendement d'extraction convenable est indispensable car la quantité d'A.D.N. existant dans le corps microbien est peu élevé (2 à 6 %) et les dosages après hydrolyse des bases puriques et pyrimidiques seraient difficiles si leur quantité était trop faible. Il faut également tenir compte de la pureté de l'A.D.N. Celui-ci doit être exempt d'ARN et de toutes impuretés polysaccharidiques et protéiques, qui perturberaient l'hydrolyse de l'A.D.N. en faisant varier le pH du milieu. Dans ces conditions des résidus apuriques pourraient subsister et il y aurait alors libération préférentielle d'adénine et de guanine entraînant une valeur du rapport $\frac{A + T}{G + C}$ entièrement fausse. Pratiquement il convient d'opérer avec un gramme de corps

bactériens secs et le rendement d'extraction doit être égal ou supérieur à 2 %.

Ces méthodes d'extraction seront donc toujours complexes d'autant plus qu'aucune technique générale ne nous paraît pouvoir être envisagée et qu'il convient en général de combiner entre elles différentes méthodes pour obtenir un rendement d'extraction convenable.

Par contre, les deux derniers temps sont beaucoup plus simples et particulièrement le dosage des bases : l'emploi d'un spectrophotomètre du type BECKMANN permettant d'apprécier des concentrations extrêmement faibles de l'ordre de 2 μ g par ml.

Nous envisagerons successivement ces différentes phases :

Isolement des acides nucléiques :

Les techniques décrites par MIRSKY et POLLISTER pour l'isolement des désoxyribonucléoprotéines à partir des tissus animaux ou végétaux sont souvent inefficaces pour les bactéries car celles-ci sont pourvues de membranes externes résistantes.

Nous avons constaté néanmoins chez les Corynebacterium des différences nettement significatives en ce qui concerne la résistance de la paroi cellulaire. Ces différences sont résumées dans le tableau (1) qui exprime l'intensité de la lyse par le rendement en A.D.N. suivant les souches et les techniques employées.

De nombreux agents peuvent théoriquement être utilisés pour l'attaque de la membrane externe du corps microbien :

— moyens mécaniques : broyage avec abrasifs ou agitation avec un mixer ;
— moyens physiques : ultrasons ,congélation ;
— moyens chimiques : emploi de détergents ;
— moyens biologiques : autolyse ou utilisation du lysosyme.

La diversité même de ces techniques souligne la difficulté éprouvée dans certains cas pour cliver la membrane bactérienne. Certaines méthodes ne sont valables que pour un nombre limité d'espèces et au sein même d'un genre ; en particulier du genre Corynebacterium, il est pratiquement impossible de mettre au point une technique générale d'extraction.

Dans le cas qui nous intéresse ici, le dosage des bases constitutives de l'A.D.N. bactérien peut être effectué sur un A.D.N. biologiquement inactif ce qui permet d'utiliser a priori des méthodes plus brutales et le choix de la technique en est théoriquement facilité. Cependant nous avons été conduit à choisir une méthode mixte, utilisant différents procédés d'extraction.

La technique de WYATT, traitement par la soude N à 37° ne change pas la composition en purines et pyrimidines de l'A.D.N. Cette méthode exige au départ un éclatement des cellules bactériennes qui peut être obtenu par l'intermédiaire d'un broyeur à ultra-

sons ou plus simplement par un broyage des corps bactériens dans un mortier d'agathe en présence de poudre de quartz. C. Palmade insiste sur l'action préférable de la poudre de verre qui ne jouerait pas seulement un rôle d'abrasif mais permettrait d'extraire des quantités beaucoup plus grandes d'A.D.N. et dont l'action serait comparable quantitativement à celle du lysozyme.

Ces données nous ont conduit à adopter la méthode suivante :

(a) Culture en Jaubert et Gory de 2 litres contenant du bouillon glucosé à 10 ‰ pour les souches microaérophiles ou culture sur gelose en plaques pour les souches aérobies. Une culture de 10 jours dans deux litres de milieu produit environ 2 à 3 g de bactéries sèches selon les espèces du genre Corynebacterium.

(b) Les bactéries sont lavées par centrifugations répétées à l'eau distillée puis traitées à l'eau saturée de chloroforme : 1 g de corps microbiens sont mis en suspension dans 10 ml d'une solution saturée en chloroforme. On agite l'ensemble 1/4 h à la température ordinaire (1).

(c) La suspension est centrifugée (2) et le culot après lavage (3) est laissé au repos 2 h à —30° C ; 0 g 10 de poudre de verre y étant préalablement incorporé (4).

A ce stade les cellules bactériennes sont généralement intactes bien que pour certaines d'entre elles (S 111 et T 2) on puisse constater déjà un début de lyse qui s'accentue au cours de la décongélation rapide. La multiplication des congélations et décongélations successives ne paraît pas augmenter sensiblement le rendement en A.D.N. Pour certaines espèces à paroi cellulaire particulièrement résistantes (C xerose et C 85) une série de dix congélations et décongélations rapides n'a pratiquement apporté aucune modification au résultat final.

Par contre la mise en contact des cellules microbiennes avec la poudre de verre dès le début des opérations, nous a paru améliorer sensiblement le rendement en A.D.N. Il est possible qu'au cours de la congélation et décongélation elle favorise l'éclatement de la paroi cellulaire.

Nous avons envisagé aussi l'action de la pénicillline, selon la méthode indiquée par J. Lederberg. Des doses infimes de pénicilline ajoutées au milieu de culture agissent sur les cellules jeunes en voie de multiplication, en inhibant la synthèse de la membrane externe. En fait ce procédé n'est valable que pour les bactéries sensibles à la pénicilline.

Les conditions requises sont alors les suivantes : à une culture jeune nous ajoutons 2 fois son volume d'un bouillon contenant saccharose et sulfate de magnésium en quantités telles que la concentration finale de l'ensemble soit de 20 % pour la saccharose et de 0,2 % pour le sulfate de magnésium. La quantité de pénicilline varie selon les espèces et leur sensibilité à cet antibiotique.

Cette étude que nous poursuivons actuellement améliore les possibilités traction des constituants cellulaires et particulier de l'A.D.N.

(d) Après décongélation le culot est remis en suspension dans une solution contenant 0,5 mg de lysozyme par ml. Le pH est ajusté à 6, 8-7 et on agite pendant 15 minutes à température ordinaire (5).

A ce stade le lysozyme attaque la membrane cellulaire plus ou moins selon les espèces. Mais en fait aucune de nos 60 souches de Corynebacterium n'est lysée complètement par le lysozyme, la plupart même demeurent inchangées pour des concentrations de lysozyme allant de 0,5 à 1 mg par ml. Il n'y a pratiquement aucune modification microscopique des cellules et la viscosité des suspensions n'est pas sensiblement augmentée. Il est cependant possible pour quelques souches d'extraire des traces d'A.D.N. à partir du liquide surnageant.

(e) Un séjour d'une nuit à —30° suivi d'une décongélation rapide améliore le rendement en A.D.N. (6).

Cette première partie des opérations qui correspond sensiblement à la technique décrite par C. Palmade permet pour certaines espèces de Corynebacterium une extraction correcte. Une homogénéisation rapide du culot (qui renfermait depuis le début 0,10 g de poudre de verre) libère dans le liquide surnageant une quantité notable d'A.D.N. et l'addition d'alcool donne alors un précipité d'une viscosité élevée.

(f) Pour la majorité de nos souches cette technique nous a paru insuffisante. Aussi poursuivons-nous à ce stade, l'extraction de l'A.D.N. par un séjour du culot bactérien dans une solution normale de soude à 37° pendant 20 h (Wyatt (7). Nous avons constaté en effet que la purification de l'A.D.N., dans ces conditions est plus aisée. La soude permettant une hydrolyse plus complète de l'A.R.N. résiduel en nucléotides.

(g) Après centrifugation (8) le surnageant est amené à pH 4 avec de l'acide acétique pur. Un précipité floconneux, constitué par des impureté, apparaît immédiatement (9). Il est éliminé et on ajoute alors un volume d'alcool qui provoque la précipitation de l'A.D.N. en 30 minutes environ (10).

(g) Le précipité contenant l'A.D.N. est alors recueilli par centrifugation (11), mis en solution dans de la soude normale. Les protéines restantes sont éliminées par formation d'un gel obtenu en agitant la solution avec un mélange de 8 parties de chloroforme et d'une partie d'Octanol (12).

(i) Le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée (13).

(j) Une précipitation par l'alcool éthylique complète la purification de l'A.D.N. qui est ensuite (14-15) lavé successivement par

l'alcool, l'alcool absolu et l'éther et séché à 110° C sous vide et en présence d'anhydride phosphorique (16).

En dépit de toutes les précautions qui ont pu être prises au cours de la technique d'extraction, nous n'avons pu, dans tous les cas, obtenir un A.D.N. très purifié. En fait tous les intermédiaires peuvent être observés selon les espèces, le pourcentage d'A.D.N. pur obtenu variant de 10 à 100 %. Il existe donc incontestablement dans un même groupe microbien des différences considérables quant aux possibilités d'extraction de l'A.D.N. par les techniques usuelles.

Quelle peut être la cause de ces différences ?

Certaines souches se lysent assez facilement. Dans ces conditions la totalité de l'A.D.N. peut être extrait et la purification est facile. Mais dans d'autres cas, fréquents chez les Corynebacterium, le clivage est très difficile (en particulier pour les souches C. xerose et C. 85). Il faut admettre alors une constitution chimique différente de la membrane microbienne dans laquelle rentrerait vraisemblablement un pourcentage non négligeable de substances lipidiques, ce qui rapprocherait sur ce plan, certaines espèces de Corynebacterium du groupe voisin des Mycobacterium.

Pour C. xerose et la souche C. 85 nous avons constaté au cours de l'extraction du culot bactérien la présence de substances lipidiques en quantité souvent importante. Il est dès lors certain que la purification de l'A.D.N. obtenu dans ces conditions peut être difficile, d'autant plus que ces souches ont, comme nous l'avons déjà signalé, une résistance particulière à la lyse et que le rendement d'extraction est toujours bas. Il ne s'agit bien entendu que d'une hypothèse, suggérée par nos résultats expérimentaux mais qui devrait être précisée par une étude chimique de la membrane de ces souches particulières.

Dans le tableau (II) nous avons exprimé le rendement d'extraction en A.D.N. pour différentes souches à chaque étape de la technique précédemment indiquée. Nous pouvons constater que pour une souche donnée, chacune de ces étapes n'est pas strictement obligatoire. C'est ainsi par exemple, que les souches S 111 et T 2 se lysent en totalité par simple mise en suspension des corps bactériens dans une solution normale de soude et même dans une solution de chlorure de sodium à 0,4 %. Néanmoins la succession de toutes ces opérations nous paraît constamment efficace quant au rendement terminal et elle devient strictement indispensable pour certaines souches dont la lyse est très difficile à obtenir. Il est possible qu'on arrive ainsi progressivement à une attaque de plus en plus prononcée de la membrane externe qui aura pour effet de libérer dans le milieu un pourcentage accru des constituants cellulaires.

C'est pour ces raisons que nous avons systématiquement adopté le processus d'extraction et de purification que nous venons de décrire.

Schéma expérimental d'extraction de l'ADN

Culot bactérien après 2 lavages Cl

(1) + 10 ml eau saturée de CHCl3
Agitation : 15 min

Suspension S1

(2) ↓ Centrifugation

Culot C2

(3) ↓ lavage

Suspension S2

(4) ↓ + 0 g 10 poudre de verre
2 H. à — 30° C

Suspension S3

(5) ↓ Décongélation
+ 0,5 mg/ml de lysozyme
pH = 6,8-7. Agitation 15 min.

Suspension S4

(6) ↓ Congélation à — 30° C, 12 heures
Décongélation

Suspension S5

(7) ↓ NaOH QS. Sol N
20 H. à 37° C

Suspension S6

(8) ↓ Centrifugation

Surnageant I

(9) pH à 4/CH3COOH
Centrifugation

Surnageant II

(10) ↑ + 1 vol. d'alcool
1/2 heure contact

Précipitation d'A.D.N.

(11) ↑ Centrifugation

A.D.N. impur

(12) ↑ NaOH N
+ CHC13 + octanol
Agitation 10 min.

Surnageant III

(13) ↑ Centrifubation
+ dialyse

Surnageant IV

Précipitation d'A.D.N.

(14) ↑ + alcool

A.D.N. purifié

(15) ↑ 3 lavages
— alcool,
— alcool absolu
— éther

(16) ↑ Séjour à 110° C
P2O5/vide

Poudre d'ADN

TABLEAU I

Rendement théorique d'extraction 100 % d'A.D.N. pur = 50 mg

Souches	(WYATT)	(C. PALMADE)	*Pénicilline*	*Résultats pers.*
S 111	95 %	100 %	100 %	100 %
B2	10 %	8 %	(Non réalisé)	10 %
8384	25 %	30 %	»	30 %
85	1 %	1 %	»	1 %
T2	100 %	100 %	100 %	100 %
La 81	3 %	1 %	30 %	30 %
C. xerose	2 %	4 %	(Non réalisé)	2 %
C. acnes	25 %	28 %	»	30 %

TABLEAU II

Rendement d'extraction en A.D.N., exprimé en mg d'A.D.N. par gramme de bactéries sèches, après action de...

Souches	*Eau distillée ou ClNa à 0,4 %*	*Congélation et Décongélation*	*Lysozyme*	*Poudre de verre*	*NaOH N*	*NaOH seule*
S 111	35 mg	37 mg	38 mg	45 mg	45 mg	35 mg
B2	0	0	1 mg	3 mg	5 mg	0
8384	0	0	5 mg	8 mg	19 mg	0
85	0	0	0	1 mg	1 mg	0
T2	30 mg	36 mg	38 mg	40 mg	46 mg	30 mg
La 81	0	0	1 mg	2,5 mg	3 mg	0
C. xerose	0	0	0	0	2 mg	0
C. acnes	0	2 mg	4,5 mg	9 mg	11 mg	0

Hydrolyse des acides désoxyribonucléiques

Cette opération nécessite tout d'abord de connaître la quantité d'A.D.N. contenue dans l'échantillon à traiter. Ce dosage est effectué par la méthode de Dische.

Protocole du dosage :

Une prise d'essai d'A.D.N. est placée dans un tube à centrifuger avec 5 ml d'acide trichloracétique à 5 %. Ce mélange est porté à 90° pendant 15 minutes. Il est ensuite refroidi et le liquide surnageant après centrifugation est transvasé dans un tube gradué de 15 ml. On opère une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Le résidu est lavé avec de l'acide trichloracétique à 2,5 %. Les eaux de lavage sont jointes aux 10 ml d'extrait et l'ensemble est amené à un volume de 15 ml (Solution A).

Deux tubes sont préparés comme suit :

Tube X (contenant la solution à doser) :

— Solution A	3 ml
— Réactif de Dische	6 ml

Tube témoin :

— Eau distillée	3 ml
— Réactif de Dische	6 ml

Les deux tubes sont portés au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, refroidis et comparés au photocolorimètre de Kipp et Engels (Filtre 610). La lecture doit être effectuée au maximum au bout de 10 minutes.

Le pourcentage d'A.D.N. contenu dans l'échantillon à analyser étant connu, il est alors possible d'en effectuer l'hydrolyse.

La composition en bases puriques et pyrimidiques des acides désoxyribonucléiques est déterminée par des techniques qui ont été parfaitement décrites dans les travaux de WYATT. Il existe deux méthodes d'hydrolyse :

— hydrolyse par l'acide formique ;

— hydrolyse à l'acide perchlorique.

Pour effectuer le premier type d'hydrolyse, un échantillon de 1 à 30 mg de A.D.N. est placé dans un tube en pyrex de 13 mm de diamètre. On ajoute 0,50 ml d'acide formique pur ; le tube est scellé et chauffé dans un four à mouffle à 175° pendant 30 minutes. Après refroidissement le tube est ouvert et l'hydrolysat est évaporé à siccité. On ajoute alors une solution aqueuse d'acide chlorhydrique normal en quantité suffisante pour obtenir une solution à 3 ou 4 % par rapport à la quantité primitive d'A.D.N. Cette solution est immédiatement pipetée et déposée sur un papier chromatographique.

Cette technique d'hydrolyse pour efficace qu'elle soit, présente cependant quelques inconvénients. Tout d'abord d'après WYATT, le temps d'hydrolyse doit être rigoureusement respecté afin d'éviter la destruction possible des bases puriques et en particulier de la guanine. D'autre part l'hydrolysat obtenu contient des polysaccharides incomplètement attaqués et qui provoquent des traînées gênantes sur le chromatogramme.

L'hydrolyse par l'acide perchlorique est effectuée en ajoutant à l'échantillon à doser une quantité d'acide perchlorique à 72 % de telle manière que la concentration en A.D.N. du mélange soit de l'ordre de 6 à 8 %. Cette opération se fait dans un petit tube de pyrex que l'on peut sceller et que l'on porte au bain-marie bouillant pendant 1 heure. Après refroidissement, l'hydrolysat est dilué avec un égal volume d'eau et le tube rapidement centrifugé pour obtenir la sédimentation du résidu de carbone. Le liquide surnageant immédiatement pipeté est porté sur un papier chromatographique.

Cette méthode nous a paru présenter certains avantages pratiques. Elle est plus rapide que la précédente et exige peu de précautions de manipulation, l'ouverture des tubes scellés contenant le mélange d'hydrolyse pouvant s'effectuer sans précautions spéciales. La possibilité d'attaque des bases puriques est moins grande. Enfin l'acide perchlorique détruit complètement les polysaccharides qui peuvent être présents sous forme d'impuretés : elles passent sous forme de carbone facilement éliminé par centrifugation. La révélation chromatographique est alors plus nette, la séparation des spots plus facile et on élimine toute possibilité de perte au cours de la migration.

Quant aux résultats quantitatifs, nous avons constaté, avec cette technique, leur remarquable constance,

Plusieurs souches de Corynebacterium étudiées trois fois de suite à des intervalles de six mois, ont donné des rapports $\frac{\text{Adénine + Thymine}}{\text{Guanine + Cytosine}}$ pratiquement identiques (Tableau III).

Tableau III

Souches	*Dosage I*	*Dosage II*	*Dosage III*
C. 8384	1,06	1,07	1,06
C. acnes	1,08	1,07	1,07
C. 73	0,60	0,60	0,61
C. B2	0,93	0,93	0,94

Séparation chromatographique et dosage des bases puriques et pyrimidiques

MARKHAM et SMITH ont montré que des solvants contenant des proportions élevées d'acide chlorhydrique peuvent être utilisés pour la résolution quantitative des hydrolysats d'acides nucléiques.

Le solvant chromatographique utilisé a la formule suivante :

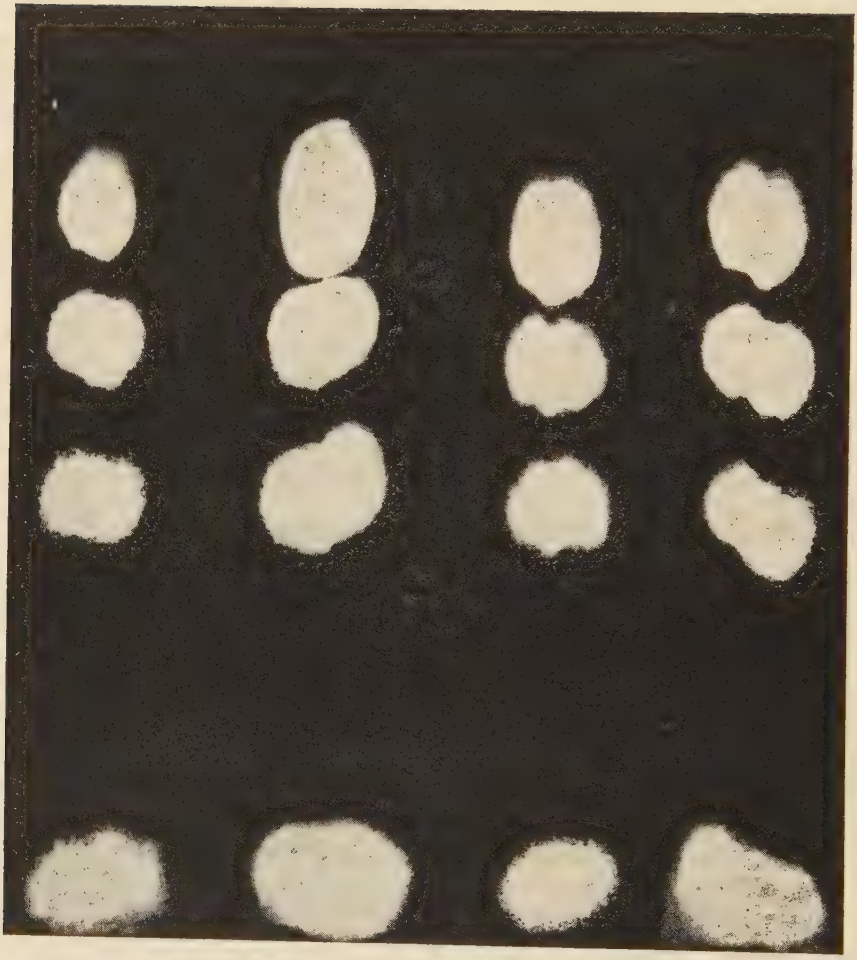
Isopropanol à 95 %	68 ml
Acide chlorhydrique (D = 1,19) ..	17 ml
Eau distillée	15 ml

Le mélange doit être fraîchement préparé pour obtenir le meilleur espacement des spots et ne peut servir qu'une seule fois.

Des quantités faibles d'hydrolysat (10 mm3) sont déposés sur du papier Whatmann n° 1 et les chromatogrammes sont réalisés par la méthode descendante jusqu'à obtenir une migration de 35 cm.

La détection des spots correspondant aux bases puriques et pyrimidiques est effectuée selon la technique photographique de MARCKMAN et SMITH en lumière ultra violette de longueur d'onde comprise entre 254 et 265 m μ. Cette méthode est particulièrement sensible et a l'avantage de donner une image exacte du chromatogramme. Le papier photographique est alors placé avec le chromatogramme sur un négatoscope ce qui permet un marquage aisé des spots.

Ceux-ci sont alors découpés en même temps que des « blancs » de forme égale qui serviront de témoins. Les spots et les témoins sont élués dans un tube contenant 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Au bout de quelques heures les éluats sont examinés au spectrophotomètre enregistreur de BECKMAN.



Chromatographie des bases puriques et pyrimidiques

Résultats expérimentaux

Nous avons effectué sur l'ensemble de nos souches l'extraction de l'A.D.N. et calculé, pour chacune d'entre elles le rapport de Ki.Yong Lee, Wahl et Barbu. Nous avons précédemment insisté sur les différences qui existaient entre les diverses espèces de Corynebacterium quant à la quantité d'A.D.N. extrait. Celle-ci rapportée au gramme de bacteries sèches varie entre 1 mg et 50 mg d'A.D.N. pur, et il est possible de distinguer schématiquement 3 groupes de Corynebacterium :

— Ceux qui se lysent complètement, et dont le taux d'extraction en A.D.N. est voisin de 5 % ;

— Ceux dont la lyse est convenable, sans être complète, et qui donnent un rendement en A.D.N. de l'ordre de 2 % ;

— Ceux enfin, à lyse faible et qui de ce fait ne libèrent que des taux d'A.D.N. inférieurs à 1 %.

Mais, pour une même espèce, et pour une technique identique la quantité d'A.D.N. extraite est constante. C'est ainsi que pour les souches figurant sur le tableau IV, on obtient dans plusieurs dosages effectués à quelques mois d'intervalle, des valeurs très voisines.

Tableau IV

Souches	*Dosage I*	*Dosage II*	*Dosage III*
C. acnes	11 mg	12 mg	10 mg
S. 111	45 mg	48 mg	47 mg
T 2	46 mg	45 mg	44 mg
C. xerose	2 mg	2 mg	3 mg
C. 85	1 mg	1,5 mg	1 mg

Les valeurs du rapport de WAHL sont groupés dans le tableau V. Pour les 60 espèces de Corynebacterium étudiés elles varient de 0,70 à 1,08.

Il est certain que le rapport d'une même espèce peut varier dans une certaine limite. KAYSER et PIERFITTE, donnent leurs résultats exprimés par la moyenne arithmétique corrigée de la déviation standard. Dans ces conditions la déviation standard est pour ces auteurs, en moyenne de ± 0,06. Il nous semble qu'une telle marge d'erreur soit exagérée. En effet nos résultats semblent plus homogènes, et d'après un calcul statistique effectué sur des résultats de 9 dosages sur l'espèce Corynebacterium acnes, notre déviation standard est plus réduite.

C. 13974	1,06
C. 3510	1,05
C. 5988	1,07
C. acnes 53119	1,08
C. 8384	1,00
C. 83473	1,05
C. 13261	1,08
C. 13429	1,00

La moyenne arithmétique est de 1,05 et la déviation standard « S » égale à 0,03 (l'espèce Corynebacterium acnes présente alors un rapport de WAHL égal à 1,05 ± 0,03).

Nous pensons que la valeur de cette déviation standard (± 0,03) est valable pour les autres espèces de Corynebacterium : elle doit représenter en effet, l'écart maximum possible, dans les conditions de notre dosage, pour l'ensemble des résultats. Ceux-ci sont donc entachés d'une erreur assez faible, variable pour chaque expérimentateur, mais dans une limite très probablement étroite. Etudions par exemple les chiffres donnés par KI-YONG-LEE, WAHL et BARBU pour trois espèces de Corynebacterium. En admettant une déviation standard égale à 0,33, les chiffres seront pour :

C. acnes	1,08 ± 0,03
C. diphteriae	0.92 ± 0,03
C. parvum	0,72 ± 0,03

Or, nous trouvons, pour ces mêmes espèces : 1,08. 0,91 et 0,70. Nous sommes ainsi dans les limites que nous venons d'indiquer, ce qui confirme encore la validité de nos résultats.

TABLEAU V

Rapport : $\frac{\text{Adénine + Thymine}}{\text{Guanine + Cytosine}}$

Souches	$\frac{A+T}{G+C}$				
14155	0,61	MSC 1	0,84	12590	0,93
73	0,60	D2K	0,84	13255	0,94
Actinobacterium israeli	0,63	13112	0,84	C. hoagii	0,94
La 81	0,70	C. fascians	0,84	C. anaerobium	0,95
T 3	0,70	57	0,85	8384	1,00
13331	0,70	45	0,85	13429	1,00
Ca 1	0,71	C. cutis commune	0,85	3510	1,05
C. equi	0,71	C. michiganense	0,86	13645	1,05
C. parvum	0,72	13967	0,86	83473	1,05
48	0,73	13467	0,88	13974	1,06
C. hofmanni	0,76	3 L'	0,88	13480	1,06
C. 14185	0,80	B 2	0,88	74	1,06
T 2	0,80	B 2b	0,88	12756	1,06
13501	0,82	51	0,89	.C pyogenes	1,07
C. xerose	0,82	85	0,89	5988	1,07
21	0,83	76	0,89	Ni	1,08
S 111	0,83	2451	0,90	C. acnes 53119	1,08
Ca 2	0,83	C. diphteriae	0,91	C. acnes 53117	1,08
		C. avidum	0,93	13261	1,08

L'étude de l'A.D.N. des Corynebacterium, montre que les rapports $\frac{\text{Adénine + Thymine}}{\text{Guanine + Cytosine}}$ ne présentent pas, pour les différentes espèces, une variation progressive, mais qu'ils se répartissent autour de certaines valeurs. Il est dès lors possible sur cette base de définir 5 groupes de Corynebacterium.

Groupe I : valeur moyenne du rapport : 0,71
Variations extrêmes : 0,68 - 0,74
Ex. : Corynebacterium hofmanni
Corynebacterium parvum
Corynebacterium equi

Groupe II : valeur moyenne du rapport : 0,82
Variations extrêmes : 0,79 - 0,85
Ex. : Corynebacterium xerose
Corynebacterium cutis commune
Corynebacterium humiferum

Groupe III : valeur moyenne du rapport : 0,86
Variations extrêmes : 0,84 - 0,90
Ex. : Corynebacterium diphteroides
Corynebacterium michiganense
Corynebacterium fasciens

Groupe IV : valeur moyenne du rapport : 0,92
Variations extrêmes : 0,89 - 0,95
Ex. : Corynebacterium hoagii
Corynebacterium avidum
Corynebacterium anaerobium

Groupe V : valeur moyenne du rapport : 1,05
Valeur extrêmes : 1,02 - 1,08
Ex. : Corynebacterium acnes
Corynebacterium pyogenes.

Si l'on compare ces résultats avec les données bactériologiques et biochimiques précédemment étudiées, on constate d'évidentes corrélations. Chaque groupe de Corynebacterium, tel qu'il a été défini par son rapport $\frac{A + T}{G + C}$ réunit des espèces dont le pouvoir glu-

lytique est constant : c'est ainsi que :

— Les Corynebacterium du groupe I ont un pouvoir glucidolytique nul ;

— Le groupe II comprend des espèces qui fermentent, le *Glucose*, le *lévulose*, le *galactose*, et le *saccharose*, et restent sans action sur le lactose et l'arabinose ;

— Les espèces du groupe III fermentent, le *glucose*, le *lévulose*, le *galactose*, le *saccharose* et l'arabinose et restent sans action sur le lactose ;

— Celles du groupe IV fermentent le *glucose*, le *lévulose*, le *galactose*, le *saccharose* et le lactose, et restent sans action sur l'arabinose ;

— Enfin, les bactéries du groupe V fermentent le *glucose*, le *lévulose*, le *galactose* et l'arabinose et restent sans action sur le saccharose et le lactose.

Les groupes II, III et IV sont assez voisins les uns des autres. Les valeurs extrêmes de leurs rapports $\frac{A + T}{G + C}$ s'intriquent. Ils fermentent d'ailleurs tous quatre glucides : *glucose*, *levulose*, *galactose* et *saccharose* dont nous avons précédemment souligné l'importance dans les clés de détermination.

Ces groupes ne diffèrent, entre eux sur le plan enzymatique que par la fermentation ou la non fermentation du lactose et de l'arabinose.

Par contre le groupe I et le groupe V s'éloignent très nettement des précédents dont ils diffèrent non seulement par les valeurs de leurs rapports $\frac{A + T}{G + C}$, mais aussi par des caractères fermentatifs particuliers.

Les souches du groupe I ont un pouvoir fermentatif nul, elles ont aussi le rapport le plus bas. Nous avons classé dans ce groupe : Corynebacterium parvum ; en effet les souches que nous avons pu étudier ont un pouvoir glucidolytique pratiquement nul (on ne constate généralement qu'une très légère attaque du glucose). Ce qui est identique aux constatations de Hauduroy et de Bergey, mais diffère de la conception de *Prévot* pour qui cette espèce est active sur le glucose, le lévulose, le galactose, le saccharose, l'amidon et le lactose. En faveur de notre description nous remarquerons, que le rapport $\frac{A + T}{G + C}$ de l'espèce Corynebacterium parvum est voisin de

0,72 et correspond donc bien à des souches dont le pouvoir glucidolytique est nul.

Par leurs zymogrammes les espèces du groupe V diffèrent moins nettement des précédents. Elles ne s'en distinguent, pour leurs caractères cardinaux que par la non fermentation du saccharose. Ce seul caractère entraîne une variation considérable du rapport $\frac{A+T}{G+C}$ dans sa valeur moyenne, de 0,20 par rapport à celle des groupes II, III et IV.

Il semble donc que les caractères de l'A.D.N. d'une espèce soit surtout influencé par le zymogramme beaucoup plus que par d'autres critères bactériologiques qui bien qu'intéressants dans la classification ne paraissent pas devoir être considérés comme cardinaux ; c'est le cas de la production de l'hydrogène sulfuré, de l'action sur le lait, sur la gélatine et de la réduction des nitrates.

Nous remarquerons que certains critères dont l'importance biologique est cependant considérable ne paraissent influencer que faiblement le rapport défini par Wahl. Corynebacterium diphteriae, qui par ces caractères glucidolytiques appartient au groupe V présente un rapport égal à 0,92 ; rapport diminué certes (en moyenne 0,10) mais dont la variation est beaucoup moins importante que celle qu'entraîne le caractère de fermentation ou de non fermentation du saccharose.

Ces constatations nous permettent de penser qu'une classification des Corynebacterium basée sur les propriétés glucidolytiques des espèces correspond à une réalité biologique.

Notre conception est résumée dans le graphique (1) et dans les tableaux suivants :

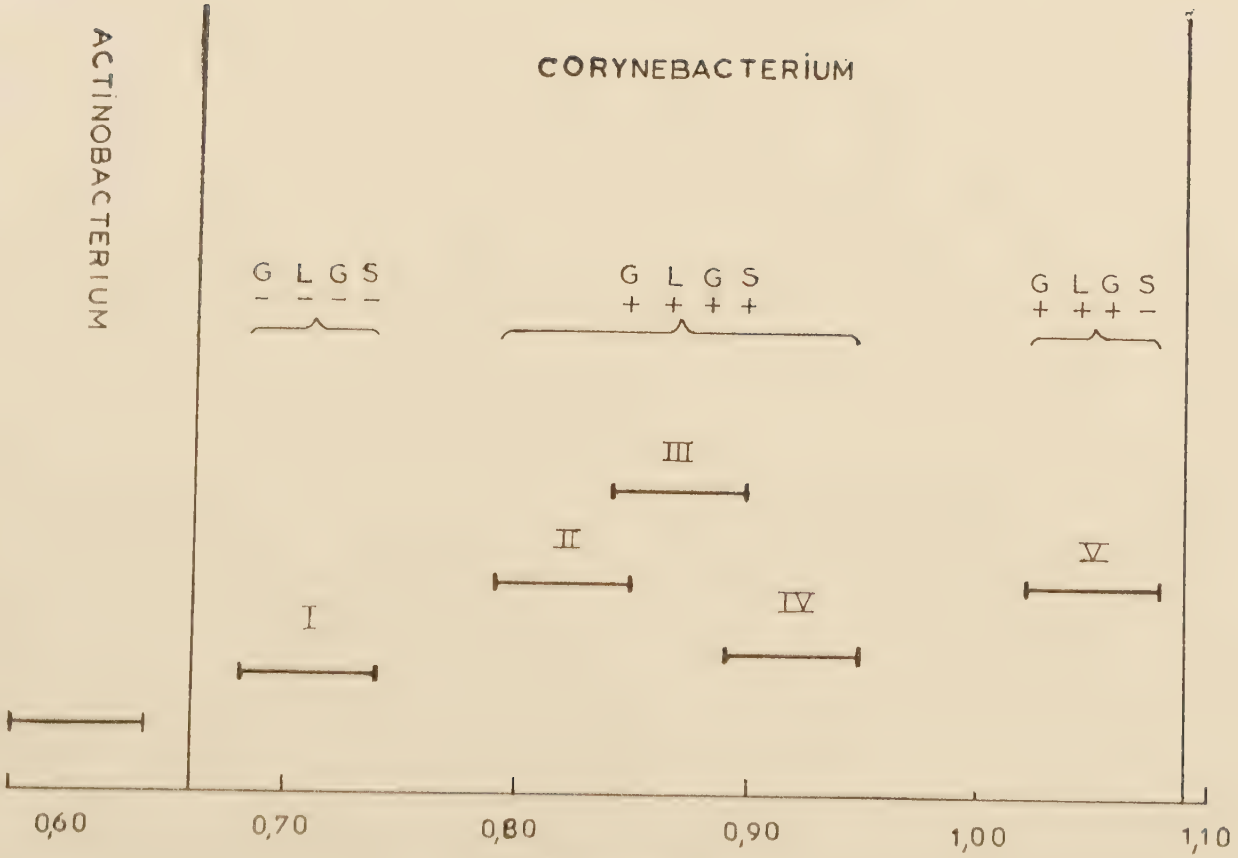
	Groupe I							Groupe II					
Origine	*Humaine*		*Animale*					*Humaine*				*Végétale*	
Sucres fermentés	0							Glu +	Lev +	Gal +	Ara —	Sac +	Lac —
Type respiratoire	A	M	A		Af		M	A			As	A	
Indol	—	+	—		—	+	+	—			—	—	
θ optima Pigmentation	37° 0	37° 0	37° 0	28° rose jaune	37° blanc jaune	37° 0	37° 0	37° 0	37° 0	37° 0	37° 0	28° jaune	28° crème
SH2	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Lait	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Gélatine	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Nitrites	+	+	—	+	—	—	+	—	+	+	—	+	—
Autres sucres		Glu (lent)						Mal	Gly Mal	Gly	Gly Mal Ami		
Espèce	C. hofmani	C. parvum	C. bovis	C. equi	C. kutscheri	C. annamensis	C. renale cuniculi	C. xerose	C. cutis commune	C. minutissimum	C. lynphophilum	C. T2	C. humiferum
$\frac{A+T}{G+C}$	0,76	0,72	0,72	0,71	0,71	0,73	0,73	0,82	0,85	0,84	0,85	0 80	0,83

A = Aérobie Af = Anaérobie facultatif M = Microaérophile As = Anaérobie strict

	Groupe III							Groupe V					
Origine	*Humaine*			*Animale*	*Végétale*			*Humaine*					*Végétale*
Sucres fermentés	Glu +	Lev +	Gal +		Ara +	Sac +	Lac —	Glu +	Lev +	Gal +	Ara +	Sac —	Lac +
Type respiratoire	As	M		A	A			M			Af		A
Indol	+	+		—	—			—	+		—		—
0 optima Pigmentation	37° 0	37° 0	37° 0	37° 0	28° jaune	28° jaune	28° crème orang.	37° 0	37° rose saumon		35° 0		22° 0
SH2	+	—	—	—	—	—	+	—	+		—		+
Lait	—	—	+	+	—	+	—	+	+		—		—
Gélatine	—	—	—	—	—	+	—	+	+		—		+
Nitrites	—	—	—	—	+	+	+	—	+		+		+
Autres sucres		Gly Mal Dex	Mal Ami	Mal		Mal		Mal Dex	Dex Mal Ami Gly		Mal Ami		Mal Gly Dex
Espèce	C. diphteroides	C. B2 »	C. 85 »	C. renale	C. rathayi	C. michiganense	C. fascians	C. pyogenes	C. acnes		C. diphteriae		C. sepedonicum
$\frac{A+T}{G+C}$	0,88	0,88	0,89	0,89	0,85	0,86	0,84	1,07	1,08		0.92		

Groupe IV

Origine	*Humaine*							*Animale*			Végétale
Sucres fermentés	Glu +		Lev +		Gal +	Ara —		Sac +		Lac +	
Type respiratoire	A	Af		As		M		Af			A
Indol	—	—	+	—	+	+		—			—
θ optima Pigmentation	30° rose	32° blanc jaune	37° jaune blanc	37° rosè saumon	37° rose saumon	37° rose saumon	37° rose saumon	37° crème orangé	37° crème	37° 0	23° jaune
SH2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lait	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+
Gélatine	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+
Nitrites	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
Autres sucres	Ami Mal Man Dex	Mal Dex Gly	Mal Gly Gly	Ami Mal Dex Gly	Mal Gly	Ami Mal Gly		Gly	Gly		
Espèce	C. hoaggi	C. granulomatis	C. enzymicum	C. avidum	C. liquefasciens	C. anaerobium	C. granulosum	C. pseudotuberculosis	C. hepatodystrophicans	C. phocae	C. insidiosum
$\frac{A+T}{C+C}$	0,94	0,95	0,95	0,93	0,94	0,95	0,93	0,90	0,91	0,93	



Graphique nº 1

Conclusion

La classification de certains groupes bactériens se heurte encore actuellement à de grandes difficultés. C'est le cas des Corynebactéries pour lesquelles, mises à part certaines « espèces médicales », les conceptions des bactériologistes diffèrent notablement.

Nous avons tenté par une étude de 60 souches de Corynebacterium d'aboutir à une clé de détermination valable. Celle-ci doit bien entendu être basée sur les caractères biologiques cardinaux des espèces.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons défini les souches étudiées, sur les plans bactériologique et biochimique ; il nous a semblé alors que le pouvoir glucidolytique devait être considéré comme prépondérant. L'étude de la constitution de l'A.D.N. et la détermination du rapport $\frac{\text{Adénine + Thymine}}{\text{Guanine + Cytosine}}$ effectuées dans une deuxième partie, nous a permis d'étayer cette conception. Elle montre qu'il existe, en fonction des variations de leur pouvoir enzymatique, des différences significatives dans la constitution de l'A.D.N. des différents groupes d'espèces.

Que la nature des acides désoxyribonucléiques conditionne les caractères de la cellule microbienne est un fait bien connu et le développement de la génétique bactérienne en a apporté des preuves définitives. Mais il est remarquable que l'on puisse trouver, par des analyses relativement commodes, des différences interprétables dans la constitution de l'A.D.N. des espèces et qu'elles soient en rapport précis avec leurs caractères enzymatiques.

Bien que les méthodes d'extraction et de dosage des bases puriques et pyrimidiques soient délicates et qu'elles soient souvent rendues difficiles par la nature particulière de la membrane microbienne qui résiste à la lyse, elles nous paraissent d'un intérêt primordial,

non seulement pour définir les genres, mais aussi pour distinguer à l'intérieur du genre des groupes d'espèces à caractères biologiques communs.

Cette technique permettrait donc à notre sens de contrôler les classifications et les clés de détermination trop souvent contingentes que l'on rencontre encore en microbiologie.

Vu : *Le Président de Thèse :*
L. BOUISSET.

Vu : *Le Doyen :*
Pour le doyen, l'assesseur :
E. CADENAT.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 18 octobre 1961

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
DOTTIN.

Bibliographie

AVERY (O.T.), MAC LEOD (C.M.) et MC CARTY (M.). — *J. Exp. Med.* 79, 137, 138, 1944.

BARATT (M.). — *J. Hyg.*, 23, 241, 1924.

BELOZERKY (A.N.). — On the nucleoproteins and polynucleotids of certain bacteria. *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.* 12, 1-6 1947.

BEERENS (H.). — *Ann. Inst. Past.*, 84, 1026, 1032, 1953.

BEERENS (H.), DEMONT. — *C. R. Soc. Biol.*, 143, 1200, 1949.

BERGEY'S. — *Manual of Determinative Bacteriology*, 6 et 7 Ed.

BOIVIN (A.), DELAUNAY (R.), VENDRELY (R.), LEHOULT (Y.). — *C. R. Acad. Sc.*, 221, 646, 647, 1945.

BOIVIN (A.), VENDRELY (R.), VENDRELY (C.). — *C. R. Acad. Sc.*, 226, 1061, 1945.

BOUISSET (L.), BREUILLAUD (J.), MICHEL (G.). — Etude bactériologique des Corynebacterium isolés de la peau humaine. *Bull. de l'Assoc. des Diplômés de la Faculté de Nancy*, 79, 3e trim. 1960.

BOUISSET (L.), BREUILLAUD (J.), MICHEL (G.). — Etude du type respiratoire des Corynebacterium isolés de la peau. *Bull. de l'Assoc. des Diplômés de Microbiologie de Nancy.*

BREUILLAUD (J.), MICHEL (G.). — Etude de Corynebacterium isolés du plasma. *Transfusion*, t. III, n° 2, 1960.

BREUILLAUD (J.), MICHEL (G.). — Etude de la microflore cutanée dans la région M. veineux du pli du coude. *Toulouse Pharmaceutique*, t. V, n° 1, 1958.

BRUNER, EDWARDS. — Kentucky Agr. ext. *Sta. Bull.* 414, 1941.

BROOKS, HUCKER. — *Jour. Bact.* 48, 309, 1944.

BURKHOLDER, WALTER (H.). — *Bergey's Manuel of determinative Bacteriology.*

CAILLE (B.). — Contribution à l'étude des antigènes des Corynebacterium anaérobies. *Thèse de Paris*, 1958.

CAILLE (B.), TOUCAS (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1960, t. 98, 276.

CHARGHAFF (E.). — Isolation and composition of the deoxypentose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins : « The nucleic acids ». *Acad. Press. New-York*, 1, 307, 372, 1955.

CRAWFORD (D.V.). — *VIe Cong. Sc. des Sols, Paris*, 197, 1956.

DARNIS, PRÉVOT et RAPIN. — *Bull. et mem. Soc. med. hôp. Paris*, 1954, 70, 344.

DISCHE (Z.). — *Microchemie*, 1930, 8, 4.

DOUGLAS (H.C.), GUNTER (S.E.). — The taxonomic position of Corynebacterium acnes. *J. Bact.*, 52, 15, 1946.

DUMAS (J.). — Bacteriologie médicale. *Flammarion, Ed.* 622, 1956.

ELLIOT. — *Manual of bacterial Plant Pathogens*, 1951.

Evans (C.A.), Smith (W.M.), Johnston (E.A.), Giblett (E.R.). — Bacteria flora of the normal human skin. *J. Of. Inv. Derm.*, 15, n° 4, 305, 1950.
Fleisher (M.S.). — *Am. J. Med. Sci.*, 224, 548, 1952.
Griffith (F.). — The significance of pneumoccocal types. *J. Hyg.*, 27, 113, 159, 1928.
Hauduroy (P.). — Dictionnaire des bactéries pathogènes. *Masson, Ed.*
Hershey (A.D.), Chase (M.). — *J. Gén. Physiol.*, 36, 39, 56, 1952.
Jensen. — *Proc. Linnean. New. So.* Wales, 65, 593, 1940.
Kayser (F.), Pierfitte (M.). — Etude du métabolisme des acides nucléiques chez E. coli sensible et résistant à la sulfanilamide. *Bull. Soc. C. bio.*, t. 43, 61, 1, 143, 1961.
King, Meyer. — Metabolic and serologic differentiation of Act. bovis and anaerobic diphteroids. *J. Bact.*, t. 74, 234, 238, 1957.
Ki-Yong Lee, Wahl (R.), Barbu (E.). — Contenu en bases puriques et pyrimidiques des acides A.D.N. des bactéries. *Ann. Inst. Past.*, 91, 212, 224, 1956.
Lederberg (J.). — *Proc. Nat. Acad. Sc. New-York*, 9, 42, 574, 1956.
Lentze. — *Zentralbl. Bakt.*, 1950, 155, 290.
Linzenmeier (G.). — *Ann. Inst. Past.*, 1954, 87, 572-579.
Linzenmeier (G.). — *Zentralbl. Bakt.*, 1, 17, 8590, 1957.
Mandin. — *Thèse de médecine de Montpellier*, 1956.
Manual. — Of Methods for pure culture studies of bacteria. *Staining methods*, IV, 51, 13.
Markham (R.). — Nucleic acids. Their components and related componds. *Modern methods of plant analysis, vol.* IV, 246, 303.
Markham (R.), Smith (J.D.). — *Biochim. Journal*, 45, 294, 1949.
Mirsky (A.E.), Pollister (A.W.). — *J. gen. Physiol.*, 30, 117, 1946.
Ordal. — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 92, 85-88, 1956.
Palant (B.L.), Kholod (A.E.), Blagodeteleva. — *J. Mikrobiol. Epid. Imm*, n° 8, 30-35, 1955.
Palmade (C.). — Acide desoxyribonucleique et desoxyribonucléo-protéines bactériennes. *Biologie médicale*, vol. L, n° 2, 129-175, 1961.
Palmade (C.), Vendrely (C.). — Sur une méthode nouvelle d'extraction de l'A.D.N. des bactéries. *C. R. Ac. Sc.*, 242, 2870-2872, 1956.
Pergola (R.C.). — *Ist. Sup. Sanita.*, 18, 286, 309, 1955.
Pillsbury (D.M.), Nichols (A.). — Bacterial flora of the normal and infected skin. *Journal of investigative. Dermatology*, 365, 1946.
Prévot (A.R.). — Détermination des bactéries anaérobies. *Monographes de l'Institut Pasteur*, 1957. Masson Ed.
Prévot (A.R.). — In Loiseleur, *Techniques de Laboratoire*, t. I, 487-482.
Prévot (A.R.). — Bactéries anaérobies. Techniques d'isolement et de détermination. *Lebert, Pacomhy, éd. Paris.*
Prévot (A.R.). — *C.R. 6e Congrès Inter. Micro., Rome*, 40, 1953.
Prévot (A.R.). — Biologie des maladies dues aux anaérobies. *Collection de l'Institut Pasteur*, 534.
Prévot (A.R.), Courdurier (J.). — *Ann. Inst. Past.*, 76, 232-238, 1949.
Prévot (A.R.), Tardieux (P.). — Recherches sur le pouvoir pathogène des espèces anaérobies strictes de Corynebacterium. *Ann. Inst. Past.*, 1, 879, 1953.
Prévot (A.R.), Thouvenot (H.). — *Ann. Ins. Past.*, 83, 443-448, 1952.
Prévot (A.R.), Thouvenot (H.). — *Ann. Ins. Past.*, t. 97, n° 2, 234, 1959.
Ryff, Brown. — *Amer. J. veter. res.*, t. 15, 617-621, 1954.
Salzeva (G.N.), Belozerky (A.N.). — *Mikrobiologuija*, t. 26, 722-728, 1957.
Segretain (G.), Drouet (E.), Mariat (F.). — Diagnostic de laboratoire de mycologie médicale. *Ed. de la Tourelle, Paris*, 1958.
Sohier, Simon, Terrane. — *Ann. Inst. Past. Lille*, t. 7, 148-158, 1955.
Strapatsaki, Cocovini (Z.). — *Ann. Ins. Past.*, 93, 647, 1957.
Walker (J.C.), Kennrick (J.B.). — Plant. nutrition in relation disease development IV. Bacterial cancer of tomato. *Amer. Jour. Bot.* 35 (3), 186-192.

Watson (J.), Crick (F.-H.C.). — The structure of DNA. *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 18, 123-131.
Welsch (M.), Demelenne-Jaminon (G.) et Thibaut (J.). — *Ann. Ins. Past.*, 72, 203-204, 1946.
Wilson (M.C.). — Jr. inheritance of resistance in alfalfa to bacterial wilt. *Jour. amer. soc. agron.*, 39, 7, 570-573.
Wollman (E.L.), Jacob (F.). — Monographies de l'Institut Pasteur. La sexualité des bactéries. *Masson éd.* 1959.
Wyatt (G.R.). — The purine and pyrimidine composition of Deoxypentose. *Nucleic Acids*, 48, 584-590, 1951. Biochem. J.